



# Regulación de la respuesta inmune en la enfermedad de Chagas

De Titto, Ernesto Horacio

1983

Tesis Doctoral

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Universidad de Buenos Aires

[www.digital.bl.fcen.uba.ar](http://www.digital.bl.fcen.uba.ar)

Contacto: [digital@bl.fcen.uba.ar](mailto:digital@bl.fcen.uba.ar)

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Fuente / source:

Biblioteca Digital de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

# REGULACION DE LA RESPUESTA INMUNE EN LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

ERNESTO HORACIO de TITTO

Tesis presentada para optar al título de  
Doctor en Ciencias Químicas.

Reg. N° 1825

1983

1825  
Ej. 2



Agradezco muy especialmente a la Dra.ELSA LEONOR SEGURA, Directora de esta TESIS, por su apoyo y guía en la realización de este trabajo, y por su permanente interés en el perfeccionamiento de mi formación científica y personal.



"Einstein decía una vez que una gran teoría física no está determinada por los hechos de la naturaleza, sino que es una creación libre de la mente humana. Quería así corregir la idea de que una teoría es sólo un resumen de hechos ordenados. En realidad, una teoría es una interpretación libre de un orden y de leyes. Pero conviene aún examinar esta libertad.

En los comienzos, los pensadores podían plantear libremente sus problemas, elegir el modo de interrogar a la naturaleza y, a partir de esta elección, fabricar los instrumentos y mecanismos destinados a recibir las respuestas. Hoy somos menos libres porque la ciencia, al desarrollarse, se ha orientado en determinado número de direcciones de las que el investigador no puede apartarse. Cada investigación implica una acción, cada acción implica una elección y, una vez que se ha elegido, ya no es posible ponerla en duda. Para descubrir un sentido en una cosa hay que dejar a un lado muchas otras cosas. Y es indudable que la ciencia actual sólo nos permite estudiar una parte del mundo exterior. Frente a la infinita variedad del mundo exterior, debemos convenir en que el desarrollo de la ciencia apenas ha comenzado, y que aún no se ha aprehendido el Todo. Estas palabras nacen más de una simple modestia que de una mística".

Robert Oppenheimer



Dedico este trabajo a:

Nicolás de Titto, Nicolasa  
Loréfice, Anacleto Estébanez y  
Albina Cobas, mis abuelos, y a  
todos los que, como ellos, lle-  
garon algún día a estas tierras  
con la esperanza de construir  
con trabajo y honradez un mundo  
mejor

Ernesto Carmelo de Titto y  
Ernestina Isabel Estébanez, mis  
padres quienes, con sus esfuer-  
zos, hicieron posible mis estu-  
dios y la realización de este  
trabajo

Claudia Poleri, mi esposa,  
quien me acompaña, apoya y a-  
lienta permanentemente.



### RECONOCIMIENTOS

La realización de este trabajo de tesis fue posible gracias al apoyo y la colaboración de las siguientes personas y organizaciones:

MARTA BRAUN, que dirigió personalmente las primeras tareas y colaboró permanentemente desde entonces en el análisis y la discusión de los resultados obtenidos, brindándome un apoyo científico y humano invaluable.

Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC) y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina (CONICET), que me becaron para realizar este trabajo.

CONICET (Subsidio N° 6638), Subsecretaría de Ciencia y Tecnología de la República Argentina (Programa de Investigaciones en Enfermedades Endémicas) y Organización Mundial de la Salud (Programa de Investigaciones en Enfermedades Tropicales), que financiaron este proyecto.

El personal del Instituto Nacional de Diagnóstico e Investigación de la Enfermedad de Chagas "Dr. Mario Fatala Chabén" (INDIECH); especialmente, CARLOS DEL PRADO, NELSON JAUREGUI, MIRTA MORENO, ADA ROSENSTEIN de CAMPANINI, ANDRES RUIZ y ELISABET SUBIAS.

Los médicos del Servicio de Cardiología del Hospital Ramos Mejía de la Municipalidad de la Ciudad de Buenos Aires; especialmente, JULIO LAZZARI, PEDRO QUAGLIOTTI y VICTOR SUEZ.

El Dr. ALVARO GIMENO, MARIA ELENA SALES y el personal administrativo del Centro de Estudios Farmacológicos y de Principios Naturales (CEFAPRIN) del CONICET.

El Dr. JUAN CARLOS PERAZZO, de la II Cátedra de Patología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires.



La Dra. RITA L. CARDONI, del Laboratorio de Inmunohematología (IHEMA) de la Academia Nacional de Medicina.

El Dr. DANIEL MANIGOT, del Servicio de Cardiología del Hospital Bernardino Rivadavia del Ministerio de Salud y Medio Ambiente.

El Dr. AMERICO OLIVARI, del Servicio de Medicina Nuclear del Instituto de Medicina Experimental "Angel. H. Roffo" de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires.

Los Dres. PATRICIO COSSIO y ROBERTO ARANA, del Laboratorio de Inmunología del CEMIC.

Los trabajos de esta tesis fueron desarrollados en el Servicio de Inmunobiología del Departamento de Investigaciones del Instituto "Angel H. Roffo" de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires, la Unidad de Inmunofarmacología del CEFAPRIN (CONICET) y el Departamento de Investigación del INDIECH, Ministerio de Salud Pública y Medio Ambiente de la Nación.



## INDICE

3	Dedicatorias
4	Reconocimientos
	CAPITULO 1: INMUNOLOGIA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.
	ANTECEDENTES Y OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO
8	Epidemiología
9	Agente etiológico e Infección
12	Formas clínicas de la Enfermedad de Chagas
	Formas aguda, indeterminada y crónica
19	Antígenos del <i>Trypanosoma cruzi</i>
20	Respuesta inmune al <i>Trypanosoma cruzi</i>
20	1. Macrófagos
22	2. Respuesta humoral
	Anticuerpos, Sistema Complemento, Complejos
	Inmunes, Interferón
29	3. Respuesta mediada por células
	Inhibición de la migración leucocitaria,
	Transformación blástica de linfocitos en cul-
	tivo, Citotoxicidad mediada por células
34	4. Otras evidencias de actividad inmune mediada
	por células
	Falta del sistema T, Transferencia de inmuni-
	dad, Efecto de la inmunodepresión
36	5. Inmunidad concomitante
37	Efecto de la infección chagásica sobre el sistema
	inmune
40	Reacciones autoinmunes en la infección por el
	<i>Trypanosoma cruzi</i>
43	Relación huésped-parásito
	1. Factores genéticos y ambientales



	2. Factores regulatorios
	3. Mecanismos de escape
48	Objetivos del trabajo
49	Tesis
	CAPITULO 2: DESARROLLO DE UNA TECNICA PARA EL AISLAMIENTO DE CELULAS INMUNOCOMPETENTES
51	Introducción
52	Materiales y Métodos
52	Suspensiones celulares
53	Gradientes de densidad: preparación, tratamiento, fraccionamiento y análisis
54	Ensayo de inoculación: preparación del inóculo, inoculación y seguimiento
55	Cultivo de linfocitos: aislamiento de células, cultivo propiamente dicho, cosecha de células y evaluación del cultivo
57	Resultados y discusión
57	Gradientes de densidad
57	Ensayo de inoculación
58	Respuesta proliferativa de células mononucleares de alta densidad
59	Conclusiones
60	Ilustraciones
	CAPITULO 3: EVALUACION DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR EN ENFERMOS CHAGASICOS CRONICOS
66	Introducción
68	Materiales y Métodos
68	Antígenos
	Antígenos de <i>Trypanosoma cruzi</i> : fraccionamiento subcelular, homogeneización y caracterización
	Antígenos tisulares: obtención y preparación
70	Pacientes



73	Aislamiento de células
73	Cultivo de linfocitos
74	Xenodiagnóstico
75	Resultados y discusión
75	Caracterización de fracciones subcelulares de <i>Trypanosoma cruzi</i>
75	Estimulación policlonal
76	Reactividad al <i>Trypanosoma cruzi</i> : relación dosis de antígeno-tiempo de respuesta, prevalencia, antígenos: homogeneizado total y fracciones subcelulares, linfocitos totales y linfocitos de alta densidad, efecto del tratamiento con drogas tripanocidas, respuesta <u>in vitro</u> y xenodiagnóstico, perfil de respuesta a antígenos de <i>Trypanosoma cruzi</i>
82	Reactividad a tejidos homólogos: prevalencia y especificidad
84	Relación del estado clínico de los pacientes con la reactividad a <i>Trypanosoma cruzi</i> y a tejidos homólogos
87	Conclusiones
88	Ilustraciones
	CAPITULO 4: RELACION ENTRE MECANISMOS INMUNES HUMORALES Y CELULARES EN LOS ENFERMOS CHAGASICOS CRONICOS
106	Introducción
108	Materiales y Métodos
108	Pacientes
108	Obtención de células inmunocompetentes y suero
109	Cultivo de linfocitos: estudio del efecto de distintos sueros
109	Determinación de anticuerpos anti- <i>T. cruzi</i> : ensayos



- de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y hemoaglutinación indirecta (HAI), ensayos inmunoenzimáticos (ELISA), ensayos de captación para la titulación de IgM específica
- 110 Evaluación de actividades mediadas por anticuerpos: actividad citotóxica mediada por anticuerpos (ADCC), actividad lítica mediada por anticuerpos
- 112 Determinación de anticuerpos reactivos con tejido homólogo: ensayos inmunoenzimáticos (ELISA), ensayos de inmunofluorescencia
- 114 Resultados y discusión
- 114 Evaluación de mecanismos celulares y humorales anti-*T. cruzi*: respuesta celular, respuesta humoral, relación entre reactividades celulares y humorales, actividad citotóxica mediada por anticuerpos (ADCC), actividad lítica
- Efecto del suero de pacientes chagásicos sobre la respuesta linfoproliferativa específica al *Trypanosoma cruzi*: suero autólogo y suero alogéneo
- 124 Evaluación de reactividades celulares y humorales contra tejidos del huésped: efecto del suero sobre la respuesta celular, respuesta celular y humoral, relación entre las respuestas celulares y humorales
- 128 Relaciones entre las reactividades celulares y humorales al *T. cruzi* y a tejidos homólogos
- 130 Conclusiones
- 133 Ilustraciones

CAPITULO 5: REGULACION DE LA RESPUESTA INMUNE EN  
LA ENFERMEDAD DE CHAGAS



151	Introducción
152	Síntesis de la labor desarrollada
155	Conclusiones del trabajo
157	APENDICE
	Abreviaturas, acrónimos y definiciones
158	BIBLIOGRAFIA

CAPITULO 1

INMUNOLOGIA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS  
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO



La infección de seres humanos por el *Trypanosoma cruzi* provoca la enfermedad conocida como Trypanosomiasis Americana o enfermedad de Chagas. Esta patología constituye, en Centro y Sudamérica, un problema médico-social tan serio que reclama las mejores esfuerzos de todos aquellos relacionados con la salud pública. Minimizar la transmisión, reducir el área endémica y controlar el desarrollo de los procesos patológicos en los pacientes son objetivos mínimos para los que se deben sumar los esfuerzos no sólo de los especialistas en medicina, biología o bioquímica, sino también en educación, economía y sociología.

#### EPIDEMIOLOGIA

La Trypanosomiasis Americana fue descrita por primera vez por Carlos Chagas en 1909 (1), pero debieron pasar varios años antes de que se hiciera evidente su magnitud como problema sanitario; hoy se sabe que el área de dispersión de su agente etiológico abarca casi todo el continente: desde los Estados Unidos de Norteamérica (2,3) hasta, aproximadamente, el paralelo 42 de latitud sur en Chile y la Argentina, y se estima que en Centro y Sudamérica está infectado el 10% de la población (4), lo que significa que la cifra de posibles pacientes es varias veces millonaria.

En la Argentina se ha evaluado la prevalencia de la infección en varias ocasiones. Los resultados más representativos son los obtenidos por estudios serológicos efectuados en la totalidad de los varones de 18 ó 20 años al momento de ser convocados al servicio militar obligatorio. Dichos resultados señalan que los porcentajes de infección han disminuido en los últimos años: de 11% de seropositividad en 1970 a 6% en 1982 (5). Estos resultados coinciden con los de estudios efectuados en comunidades rurales que, además, señalan que la prevalencia de la infección



chagásica crece con la edad y que los porcentajes de infección dependen de las condiciones socio-económicas de los habitantes (6). Este hecho está vinculado a la precariedad de las viviendas y a la adaptación de algunos insectos vectores del parásito, originariamente selváticos, al ambiente domiciliario y peridomiciliario. Aunque la persistencia de reservorios selváticos con ciclos de infección en animales silvestres hace virtualmente utópica la erradicación definitiva del *T. cruzi*, la disminución del número de triatominos en la vivienda humana trae como consecuencia la interrupción de la transmisión (7), por lo que la actividad constante de las campañas de control tiene una importancia relevante en la limitación de la infección.

#### AGENTE ETIOLOGICO E INFECCION

El agente etiológico de la Trypanosomiasis Americana es el *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* (*Phylum Protozoa*, Superclase *Mastigophora*, Orden *Kinetoplastida*) que, en su ciclo de vida, es huésped alternado de insectos y mamíferos. En ambas etapas su especificidad de huésped es muy baja y, así como parasita numerosas especies de los géneros *Triatoma*, *Pastrongylus* y *Rhodnius* (y otros miembros de la Familia *Reduviidae*), infecta normalmente a miembros de, por lo menos, ocho órdenes distintos de mamíferos(8).

En su ciclo de vida, el *T. cruzi* presenta distintos estadios fisiológica y morfológicamente distinguibles, caracterizados según el flagelo (su nacimiento junto al cinetoplasto, curso intracelular y punto donde emerge libre del citoplasma) y la posición relativa del cinetoplasto respecto del núcleo celular (9). En la luz del tracto intestinal del insecto los parásitos se multiplican extracelularmente como epimastigotes (flagelo emergente desde la re-



gión lateral anterior, cinetoplasto anterior al núcleo) y se transforman en tripomastigotes metacíclicos (flagelo emergente desde el extremo apical posterior, cinetoplasto posterior al núcleo), que se acumulan en la ampolla rectal y son excretados con las heces (10,11). Los Reduviideos defecan durante e inmediatamente después de la alimentación, por lo que los tripomastigotes son excretados en el entorno del área picada por el insecto; este hecho y la respuesta refleja de rascarse después de la picadura favorecen la invasión del huésped mamífero (12).

Los tripomastigotes que penetraron a través de la piel o de las mucosas del mamífero pueden infectar cualquier célula del organismo. El mecanismo de esta infección fue estudiado in vitro en células en cultivo y es, esencialmente, el mismo en todos los casos (13): es un proceso activo que, además, involucraría la participación de sustancias quimiotácticas producidas por el huésped (14), y que permite al tripomastigote llegar al citoplasma celular para diferenciarse a amastigote (sin flagelo evidente al microscopio óptico). Después de reproducirse por fisión binaria, el parásito se rediferencia en tripomastigote y escapa al líquido intersticial o a la sangre con destrucción de la célula huésped, varios días después de la infección (10,15).

Los tripomastigotes circulan en el torrente sanguíneo y, con él, pueden alcanzar cualquier parte del organismo e invadir otras células, fundamentalmente las fibras musculares lisas, estriadas o cardíacas, o las células del sistema retículo endotelial (16). Si bien no parasitarían las células nerviosas, sí pueden hacerlo en las gliales (17). La aparente predilección por algunos de estos tipos celulares hizo clasificar a los parásitos de distintas



cepas en mio o reticulotrópicos, pero la base de este tropismo celular es desconocida y no siempre hay acuerdo entre los resultados in vitro e in vivo (18,19,20). Mas aún, hay antecedentes de que la selectividad podría cambiar durante el curso de la infección (21).

Los tripomastigotes circulantes son los responsables de cerrar el ciclo de transmisión, ya que son las formas que tomará otro insecto cuando se alimente con la sangre de un mamífero infectado. Al ingresar en el tracto digestivo del insecto, los tripomastigotes se diferencian hasta epimastigotes (intestino medio ) (10).

Debe mencionarse, además, que se ha demostrado la posibilidad de infección transplacentaria. La incidencia de este tipo de transmisión varía según el grado de endemidad de las zonas estudiadas: 2,3% en Córdoba (22) ó 0,5% en la provincia de Buenos Aires (23). También es importante controlar la serología de los dadores de sangre, porque es posible transmitir el *T. cruzi* al transfundir (24) extendiendo el área de infección al medio urbano.

Las distintas formas del parásito son cultivables in vitro en medios axénicos: desde hace muchos años para los epimastigotes (25) y, más recientemente, para tripomastigotes (26) y amastigotes (27).



## ENFERMEDAD DE CHAGAS

En la Trypanosomiasis Americana pueden distinguirse 3 estadios o formas clínicas: 1) enfermedad aguda que se presenta en el 5% de los sujetos infectados. El 95% restante no presenta sintomatología o la presenta en forma inespecífica; 2) fase latente, y 3) enfermedad crónica, que se hace aparente en el 30-40% de los pacientes (28).

### Enfermedad aguda

Comprende la primoinfestación parasitaria y el cuadro panvisceral de generalización. Las manifestaciones agudas aparecen lentamente después de un período de incubación de 3 a 12 días con un cuadro clínico muy proteiforme.

La evidencia de puerta de entrada del parásito (chagoma de inoculación) es notable en una fracción importante de los casos agudos sintomáticos -75 a 100%- (28-30), ya sea en su presentación ocular (signo de Romana) o cutánea, y constituye un elemento de alto valor diagnóstico. La sintomatología incluye: hipertermia con intensidad y duración variables; irritabilidad, cefalalgias y mialgias; astenia, anorexia y, a veces, somnolencia; dolores osteoarticulares; edemas de localización diversa, petequias y exantemas (esquizotripánides); adenopatías, satélites y/o generalizadas, hepato y esplenomegalia, sobre todo en lactantes e infantes y, ocasionalmente, diarreas y vómitos, también en lactantes (31).

En un alto porcentaje de casos -60 a 100%- (6,30,31) hay compromiso cardíaco (miocarditis o pancarditis aguda) y, en menor porcentaje -30%- (32), compromiso neurológico (que puede llegar a la meningoencefalitis); ambos se presentan con mayor frecuencia e intensidad entre los lactan-



tes infectados, y su severidad guarda estrecha relación con el pronóstico. Algunos investigadores opinan que la agresión cardíaca y encefálica estaría presente en todos los casos aunque, en algunos, se mantendría inaparente (29).

Dadas las características socio-económicas de la epidemiología de la enfermedad de Chagas, las cifras reales de mortalidad en fase aguda son difíciles de definir, aunque es posible asegurar que no son altas: por ejemplo, sólo 3 de 73 casos agudos de un estudio longitudinal realizado durante 40 años en la región de Cuyo (31), ó 33 de 1232 casos en la experiencia de S.Mazza (33).

#### Fase latente

Cabe aquí discutir si deben o no llamarse "enfermos" a los infectados inaparentes. Si consideramos que la aparición y evolución posterior de la sintomatología es gradual y que su incidencia está directamente relacionada con la antigüedad de la infección, podemos considerar que estamos en presencia de un proceso de evolución lenta que se desarrolla solapadamente desde el comienzo de la parasitosis. Por lo tanto, desde un punto de vista biológico y no clínico, para nuestro criterio, todo sujeto infectado con el *T. cruzi* debe ser considerado enfermo.

#### Enfermedad crónica

La llamada forma crónica de la enfermedad de Chagas afecta con grado variable de compromiso a distintos sistemas y aparatos del organismo. Los órganos más frecuentemente afectados son el corazón y los del tubo digestivo. Hasta el presente no hay una explicación definitiva de cuáles son los mecanismos etiopatogénicos, ni si éstos



son comunes para los distintos órganos involucrados; ni siquiera se sabe si las formas crónicas son secuelas de la enfermedad aguda o manifestaciones tardías e independientes de la infestación. A este respecto, cabe señalar

que la mayor prevalencia de patología en la fase crónica se presentaría en los pacientes que tuvieron manifestaciones clínicas durante la fase aguda (34); y que existe una significativa correlación entre la forma clínica y el área geográfica de infestación, aunque se ignora si esta asociación se relaciona con la variabilidad de los parásitos, de los huéspedes, de las condiciones ambientales y nutricionales, de más de uno de estos factores y/o de otros aún desconocidos.

El compromiso cardíaco es la manifestación más frecuente y de mayor importancia de la forma crónica de la enfermedad de Chagas en la Argentina (7,35). Por lo común, se manifiesta varios años después de adquirida la infección, a edades significativamente más tempranas que otras cardiopatías. En general, evoluciona en forma lenta, progresiva e irreversible, aunque puede detenerse pero no retroceder.

Clínicamente, puede presentarse con palpitaciones, mareos, síndromes de Stokes-Adams y/o disnea de esfuerzo, edemas en los miembros inferiores, hepatomegalia y desdoblamiento del segundo ruido en foco pulmonar, es decir, con síntomas de trastornos del ritmo cardíaco y/o de insuficiencia miocárdica. Debe destacarse que no pocos trastornos realmente severos pueden ser asintomáticos. Las imágenes radiológicas muestran que el tamaño cardíaco evoluciona desde la normalidad hacia la cardiomegalia, por dilatación e hipertrofia principalmente de las cavidades izquierdas; con punta cardíaca redondeada.



Las anormalidades electrocardiográficas más frecuentes corresponden a trastornos en la conducción del impulso eléctrico y en el ritmo cardíaco, aunque se puede encontrar cualquier tipo de alteración electrocardiográfica conocida. Entre los primeros predomina claramente el bloqueo de rama derecha, solo o combinado con el hemibloqueo o bloqueo del fascículo anterior de la rama izquierda; mientras que la arritmia más frecuente es la debida a extrasístoles ventriculares, generalmente polifocales, que pueden desembocar en períodos de taquicardia ventricular y aun matar súbitamente al paciente por fibrilación ventricular (36). Los estudios de electrocardiografía dinámica (sistema Holter) han permitido detectar un considerable número de arritmias ventriculares complejas en pacientes aparentemente "sanos", como así también procesos de mayor severidad en pacientes con arritmias leves en el ECG basal. Es preciso hacer notar que el descenso en el umbral de detección que permite esta técnica alcanza también a los sujetos aparentemente sanos, por lo que es aún materia de discusión la exacta interpretación de estos resultados.

El empleo de pruebas de esfuerzo graduado (ergometría) resulta de suma utilidad en estos pacientes, no sólo porque permite evaluar la reserva cardíaca del individuo, sino porque pone en evidencia o agrava trastornos cardíacos silentes o mínimos en condiciones de reposo.

Recientemente se ha propuesto el empleo de ajmalina para evidenciar anormalidades electrocardiográficas. La administración intravenosa de este fármaco en sujetos infectados por el *T. cruzi* ha permitido detectar distintos cambios del ECG, compatibles con la miocardiopatía chagásica, en 35 de 101 pacientes estudiados (37).



Por tanto, el empleo de este método de detección inespecífica de daño miocárdico, así como de los registros continuos y de las pruebas de esfuerzo, amplían significativamente la fracción de enfermos con compromiso cardíaco.

Las imágenes obtenidas con el empleo de la cámara gamma muestran áreas cardíacas no homogéneas con un perfil característico, el aumento de las cavidades cardíacas, la disminución del flujo miocárdico efectivo y la existencia de focos de hipermotilidad (38).

Los estudios histopatológicos revelan anormalidades en distintas áreas cardíacas, especialmente sobre el sistema de conducción aurículo-ventricular y en el nódulo sinoauricular. Las lesiones sobre el sistema de conducción son complejas e incluyen fibrosis, esclero-atrofia, infiltración por tejido adiposo y células mononucleares. Se presentan desde el nódulo aurículo-ventricular, preferentemente sobre la rama derecha del haz de Hiss y, en menor medida, sobre los haces anteriores de su rama izquierda. Esta miocarditis, microfocal y difusa, es compatible con los trastornos de conducción eléctrica antes mencionados. Las lesiones en el nódulo sinoauricular son semejantes: áreas de fibrosis, que aumentan el estroma nodular, e infiltrados con células mononucleares; las fibras musculares aparecen fragmentadas, vacuolizadas y/o atrofiadas e infiltradas con adipocitos. Estas lesiones explicarían los problemas de ritmo cardíaco antes citados. La miocarditis no se limita a la porción de conducción sino que se extiende al miocardio contráctil, con áreas de fibrosis evolutiva y difusa, necrosis y edema, e intensos infiltrados de células mononucleares (39). Otra lesión característica de la miocardiopatía chagásica es el aneurisma apical.



Finalmente, debe destacarse que el hallazgo de nidos de parásitos intracardíacos no es frecuente (40).

Los trastornos neurológicos y digestivos de la enfermedad crónica incluyen paresias, parálisis, síntomas cerebelosos, disartria, anartria y megavísceras, especialmente megaesófago y megacolon (42).

Los estudios de rutina necesarios para diagnosticar estas alteraciones digestivas son radiológicos, empleando sustancias de contraste, para estudiar fenómenos de dilatación y dinámica. Resultan también de gran utilidad los estudios endoscópicos, especialmente en el esófago, y la manometría para caracterizar el tipo de disturbio contráctil.

Desde el punto de vista histológico, las lesiones se distribuyen irregularmente, sin relación aparente con la presencia de parásitos, y afectan tanto a neuronas como a células de Schwann, fibras nerviosas y componentes de la vaina. Pueden verse, además, focos de células mononucleares infiltradas en las fibras musculares, así como células musculares lesionadas (43).

El compromiso de los distintos componentes del tubo digestivo parece tener como denominador común la denervación focal del sistema nervioso autónomo (41). Se ha propuesto que la destrucción de algunas neuronas induciría el aumento del número de vesículas secretoras de neurotransmisores en las restantes neuronas, lo que resultaría en estímulos focales incoordinados que definirían zonas de hiperperistaltismo infructuoso y explicarían el desarrollo de megavísceras (40,46).

Esta hipótesis ha tenido confirmación farmacológica: la administración de sustancias colinérgicas (metacolina, por ejemplo) a enfermos chagásicos indujo respuestas hiperreactivas de musculatura lisa (44), además de sudora-



ción, broncoespasmo y bloqueo aurículo-ventricular transitorio (45). Estos resultados son coherentes con el conocido fenómeno de "hipersensibilidad por denervación", en el cual la falta de nervio o de sus terminaciones potencia los efectos de los neurotransmisores; y sugieren, además, que la destrucción neuronal no está limitada al tubo digestivo.

La reducción del número de neuronas del plexo mientérico en los enfermos chagásicos ha sido demostrada en esófago, estómago y duodeno, yeyuno, apéndice ileo-cecal, y colon y recto (42). Aunque no se ha determinado una relación de proporcionalidad entre el número de neuronas destruidas y la disfuncionalidad, se ha propuesto que la aparición de síntomas requiere que la destrucción neuronal supere el 50% del contenido del plexo mientérico (41). Por otro lado, la necesidad de que el proceso de destrucción sea un fenómeno activo puede desprenderse del hecho demostrado de que el número de neuronas disminuye con la edad, sin que sea acompañado del desarrollo de megavísceras.



### ANTIGENOS DEL TRYPANOSOMA CRUZI

La metodología empleada para la caracterización antigénica del parásito va desde la clásica separación física de sus distintas partes y el aislamiento químico de sus constituyentes hasta la moderna producción de anticuerpos (Acs) monoclonales, pasando por el análisis de los Acs inducidos in vivo por la infección con el *T. cruzi* o sus componentes.

La heterogeneidad antigénica del *T. cruzi* fue demostrada al obtener numerosas (30 a 36) bandas de precipitación por reacción de sueros hiperinmunes con el sobrenadante de 10 000 x G del lisado de epimastigotes (47,48). Parte de estos Acs mostraron reactividad cruzada con Acs de *T. congolense* y, en menor medida, con *Leishmania donovani* (48).

Sin embargo, no se ha encontrado una variación sistemática del perfil antigénico del *T. cruzi* a lo largo de sus diversos estadios o, sobre todo, de la multiplicación en un mismo huésped. Esto es opuesto a lo que se ha demostrado en los tripanosomas africanos (49), que modifican permanentemente su perfil antigénico, lo que permite al parásito escapar de la respuesta inmune del huésped. En términos generales, aunque se han encontrado diferencias estructurales y antigénicas en la membrana de los distintos estadios del *T. cruzi* (50-59), un buen número de determinantes antigénicos permanece estable a lo largo del ciclo de vida del parásito (57,60-64). Más aun, numerosos investigadores coinciden en afirmar que no hay diferencias importantes entre los Acs que pueden detectarse en parásitos de distintas cepas (59,65-67), aun los realizados en regiones geográficas distantes entre sí, o a partir de huéspedes de distintas especies, aunque recientemente se



han presentado evidencias en contrario (56).

El fraccionamiento subcelular del *T. cruzi* permitió caracterizar el perfil antigénico de los distintos componentes del parásito (68,69) y, como veremos más adelante, relacionar su citoestructura con el desarrollo de mecanismos de agresión y/o de defensa en la relación huésped-parásito.

También ha sido demostrada la presencia de Ags de *T. cruzi* en la circulación de huéspedes infectados (70-72). Este hecho bien podría estar relacionado con la capacidad del parásito, demostrada en tripomastigotes y amastigotes de varias cepas (73-77), para movilizar hacia uno de sus polos los Acs fijados a sus Ags superficiales (formación de casquetes o "capping") y endocitar o liberar al medio circundante los complejos Ag:Ac.

Distintos autores han demostrado que Ags parasitarios libres se adsorben a las células del huésped (78-80), y han propuesto que, in vivo, un mecanismo semejante mediaría fenómenos de autoagresión vinculados con las manifestaciones patológicas de la enfermedad (81).

También ha sido propuesta la existencia de alguna similitud estructural entre Ags del parásito y Ags propios del huésped (82). Aunque la base experimental es indirecta, esa suerte de mimetismo permitiría al parásito disimular su presencia y haría al huésped vulnerable, por reactividad cruzada, desencadenando mecanismos de autoagresión.

## RESPUESTA INMUNE AL TRYPANOSOMA CRUZI

### 1. PAPEL DE LOS MACROFAGOS

El parásito, tras penetrar en el huésped mamífero, invade sus células (15). En el caso particular de las células



de la serie monocito-macrófago (o sistema retículo endotelial) la incorporación ha sido documentada hace mucho tiempo (83) pero su mecanismo es aún discutido: hay evidencias de que puede ocurrir tanto pasivamente, por fagocitosis (84-87), como activamente, en células cuyos mecanismos fagocitarios fueron bloqueados (88). Es muy probable que ambos caminos tengan lugar independiente y paralelamente: de hecho, la infección de células no fagocíticas (89) demuestra fehacientemente la capacidad de los tripomastigotes para penetrar activamente en las células del huésped.

Los factores que pueden influir en la penetración de los parásitos en los macrófagos están siendo estudiados actualmente: tanto en lo que se refiere al parásito, sus formas cíclicas (90-94), sus cepas (90,92,95-97), y sus requerimientos metabólicos (98), como al efecto de sueros (93,99,100) y drogas (91,94,101-103) sobre los macrófagos.

Después de la penetración, y por mecanismos aún desconocidos pero, evidentemente, efectivos, el parásito puede escapar del fagosoma a la matriz citoplasmática (84-86) para transformarse en amastigote. Durante algún tiempo se pensó que allí se alojaría en vacuolas con membrana (104) pero, actualmente, se acepta que dichas formaciones son sólo artificios de técnica (105). Los factores que influyen en la destrucción de los parásitos dentro de las células fagocíticas son numerosos y sólo están muy parcialmente aclarados (100,102,106).

Es un hecho bien conocido que las células de la serie monocito-macrófago son cruciales para la sensibilización de los linfocitos T (107). Si bien hasta el presente no hay datos que se refieran específicamente al papel de aquéllas en la inmunización contra el *T. cruzi*, puede supo-



nerse que son las responsables del procesamiento de los Ags parasitarios para su presentación a los linfocitos que, como en toda inmunización, resultan así específicamente sensibilizados. Esto conferiría a los macrófagos una enorme importancia en la iniciación de la respuesta anti-*T. cruzi*.

Esta misma serie celular tiene también un papel importante en la etapa efectora de dicha respuesta, y son pruebas concluyentes de esto: 1) los animales de experimentación cuyo sistema retículoendotelial está estimulado específica (108,109) o inespecíficamente, tanto sea por BCG (89,108, 110,111), *Toxoplasma gondii* (112), *Besnoiti-dis jellisoni* (113), como por linfoquinas (114) o drogas (115,116), presentan mayor resistencia a la infección; 2) por el contrario, la infección es más grave en los animales con el sistema previamente bloqueado (117,118), y 3) las cepas de ratones capaces de generar factor(es) que activa(n) a los macrófagos en su capacidad tripanocida son más resistentes a la infección que aquellas en las que la producción de dicho(s) factor(es) es menor o más tardía (119).

En conclusión, si bien hay diferencias individuales relacionadas tanto con el huésped como con el parásito, éstas son más cuanti que cualitativas y es evidente que los macrófagos desempeñan un papel dual en la infección con *T. cruzi*: por un lado, ofrecen al parásito un habitat para la vida y la reproducción y, por el otro, participan activamente en la respuesta anti-parásito, tanto en su faz de inducción como en su faz efectora.

## 2. PAPEL DE LA RESPUESTA HUMORAL

### 2.1. Anticuerpos



La existencia de una respuesta inmune humoral específica contra el *T. cruzi* es un hecho incontrovertible: tanto es así que, si bien sólo la demostración de la presencia del parásito en un organismo sería prueba irrefutable de infección, la detección de Acs específicos es, actualmente, el criterio diagnóstico de certeza de infección por *T. cruzi*.

Como en toda primoinmunización, la primera inmunoglobulina (Ig) específica detectable en el suero es la IgM, que aparece 3-4 días después de la infección y presenta su máxima concentración hacia los días 15-20, para luego descender. Este descenso es acompañado de un aumento de la IgG específica, que se hace detectable 10-15 días después de la infección (120-122).

No hay acuerdo generalizado en cuanto a los niveles plasmáticos de  $\gamma$ -globulina ( $\gamma$ -G), y de las distintas inmunoglobulinas, en la fase aguda de la enfermedad: se han informado valores normales de  $\gamma$ -G, IgG, IgM (123) e IgA (121,123), o bien valores altos, tanto de  $\gamma$ -G (124) como de IgM e IgG (120,121,125). En cambio, son más constantes los resultados obtenidos para la fase crónica:

$\gamma$ -G aumentada (123,126), IgM normal (120,123,125,127), IgA normal (123) e IgG normal (125,127) o aumentada (120,123). Un trabajo reciente (128) agregó a esta información la presencia de niveles altos de IgE tanto en fase aguda como crónica. De todas maneras y, más allá del contenido total de Igs, los Acs específicos se conservan siempre significativamente superiores a los de sujetos no infectados, sin que, hasta el presente, se conozcan datos que demuestren fluctuaciones temporales significativas en sus títulos a lo largo del período crónico de la enfermedad, ni relación con el estadio clínico (129).



El polimorfismo de la respuesta por Acs anti-*T. cruzi* queda evidenciado no sólo por la cantidad de determinantes antigénicos que reconocen, sino también por la variada capacidad funcional de las Igs específicas: hay Acs aglutinantes, precipitantes, líticos, fijadores de complemento, citofílicos, etc., los que, a su vez, tienen distinta cinética de aparición después de la infección. Así, los Acs responsables de la aglutinación directa (130) y de la inmunofluorescencia indirecta (132) son los primeros en ser detectables; luego aparecen Acs fijadores de complemento (130) y, por fin, los detectables por ensayos de hemoa-glutinación (130,132). Pero, sea cual fuere su momento de aparición, todos tienen alta especificidad y parecida utilidad diagnóstica, aunque la certeza de infección requiere el empleo de, por lo menos, 2 reacciones serológicas. Este polimorfismo funcional ha sido largamente demostrado por diversos autores, tanto en la enfermedad humana como en modelos experimentales. Ya en 1944 fue documentada la existencia de Acs anti-*T. cruzi* con capacidad para aglutinar y para precipitar parásitos (133,134) y, mucho más recientemente, fue demostrada la existencia de Acs capaces de mediar in vitro la lisis de formas tripomastigote del parásito (135,140). Si bien estos Acs líticos están aún en estudio, se ha visto que aparecen sólo en pacientes crónicos (138) y que su actividad disminuye o desaparece cuando son tratados (138,139). Otras evidencias recientes de la variada actividad funcional de los Acs anti-*T. cruzi* están dadas por los siguientes hechos: 1) algunas cepas de parásitos, pero no todas, pueden inducir la formación de Acs neutralizantes, capaces de anular la infectividad de los parásitos (141,142); 2) existen Acs capaces de interactuar con los leucocitos para mediar



fenómenos de citotoxicidad (143); y 3) la existencia de Acs citofílicos (144). Otra demostración de la heterogeneidad de los Acs en la enfermedad humana se obtuvo por la purificación de Acs anti-distintas fracciones subcelulares de *T. cruzi* : se aislaron Acs con alta capacidad fijadora de C' y baja actividad precipitante (anti-Mc) y Acs con baja capacidad lítica (anti-CS) (145). Esta probada diferencia de afinidad de Acs dirigidos contra distintos Ags del parásito y la demostración, a través de la producción de Acs monoclonales, de que distintos Acs no tienen igual afinidad por los distintos estadios del parásito<sup>(57)</sup> remarcaban el amplio espectro de actividades biológicas tanto de los Acs como de los Ags del parásito.

El papel activo de los Acs específicos en la defensa del organismo infectado ha sido demostrado con experimentos de transferencia pasiva de protección con sueros inmunes y mediante el empleo de animales genéticamente inmunodeficientes (146) como modelos experimentales. Los experimentos de transferencia pasiva han resultado contradictorios: mientras algunos investigadores han logrado proteger animales de experimentación contra un desafío con dosis letales de parásitos por la inoculación previa de suero de animales inmunes (146-154), otros no lo han logrado (155-157), o han encontrado que la transferencia de protección requiere el empleo de parásitos de una misma cepa en las dos etapas (148), o bien, que la protección depende de la antigüedad de la infección (158).

Otra demostración de que los Acs participan activamente en los mecanismos de protección a la infección aguda resultó del empleo de ratones con baja capacidad de respuesta por Acs ("Biozzi Low Responders") (159,160) y ratas genéticamente deficientes en linfocitos B (161): en



ambos casos la infección aguda fue exacerbada.

En resumen, la presencia siempre demostrable de Acs específicos contra el *T. cruzi* en la enfermedad de Chagas y en sus modelos experimentales es especialmente útil para el diagnóstico y para estudios epidemiológicos sin que, hasta el presente, se haya relacionado claramente con el estado clínico del huésped.

## 2.2. Sistema complemento (C)

La participación del sistema C en la defensa del huésped infectado por el *T. cruzi* es múltiple. Por una parte, coadyuva con los Acs, por ejemplo: su presencia es "conditio sine qua non" para evidenciar in vitro su capacidad lítica (162), mecanismo que, in vivo, muy posiblemente sea activo sobre las formas circulantes del parásito. Apoya esta idea la demostración de que los tripomastigotes circulantes en ratones infectados pueden llevar moléculas de Acs ligadas a su superficie, lo que los hace susceptibles a la lisis por el simple agregado de C (136). Por otra parte, en distintos sistemas experimentales se ha demostrado que el <sup>C</sup>participa activamente en la fagocitosis: la activación de receptores específicos capaces de ligar a productos de degradación de algunos componentes del C desencadena la fagocitosis en células mono y polinucleares (163).

La importancia del papel del sistema C en el control de la infección por *T. cruzi* resulta de numerosas evidencias indirectas, como la refractariedad de las aves a la infección con el *T. cruzi* (164); durante mucho tiempo esto se atribuyó a la presencia de "Acs naturales" hasta que pudo demostrarse que la inmunidad de las aves se debe a que los parásitos activan la vía alternativa del C (165-168).



Lamentablemente para los seres humanos, este mecanismo no se desencadena en los mamíferos. Aunque los animales con el C desactivado hacen infecciones agudas más graves (135,169), la infección de ratones y cobayos genéticamente deficientes en distintos componentes del C no mostró diferencias en el curso de la infección ni en su desarrollo, ni en la sobrevida (170), lo que sugeriría que el papel de la vía clásica del C no es central en la resistencia al *T.cruzi*.

Además, la infección experimental de distintas cepas de ratones mostró que la susceptibilidad al *T.cruzi* es correlativa con la complementemia (171), hecho relacionado con la capacidad del parásito para liberar factor(es) con actividad anticomplementaria (172) y con la demostración de que la concentración sérica de C3 y de la proteína amiloide P (SAP), reactantes de fase aguda, acompañan la parasitemia (173).

Estas aparentes discrepancias podrían ser explicadas de varias maneras, la más evidente de las cuales es la diferencia de metodología, sobre todo en el uso de parásitos de distintas cepas que, como ya se discutió, pueden presentar importantes diferencias estructurales y funcionales. Pero más importante podría ser el hecho de que muchas cepas de ratones, a pesar de ser deficientes en ciertos factores del C, tienen vidas "normales" y no son especialmente susceptibles a las infecciones, lo que sugiere la existencia de mecanismos humorales aún desconocidos capaces de compensar esas deficiencias.

En lo que se refiere a la relación entre C y enfermedad de Chagas en el ser humano, no hay demasiada información: los datos conocidos no muestran diferencias estadísticamente significativas en la actividad hemolítica total ni



en las concentraciones séricas de algunas de sus fracciones, comparando infectados asintomáticos y sintomáticos, aunque sí presentan diferencias individuales bastante importantes (174).

### 2.3. Complejos inmunes

Varios investigadores han descripto la presencia tanto de Ag como de complejos inmunes circulantes (CIC) en la infección por *T. cruzi* experimental y humana (175-177), y demostraron también que estos CIC contienen Ags de *T. cruzi* (177). En realidad, dada la presencia constante del parásito y de los Acs anti-*T. cruzi* en el organismo infectado, la existencia de CIC no debe llamar la atención; en cambio, queda por dilucidar si, como se ha demostrado en respuestas a otros Ags, tienen un papel importante en la regulación de la respuesta específica. Si bien se ha demostrado la acumulación de gammaglobulina tanto en glomérulos (178) como en corazón y vasos (179) de ratones infectados, no se conocen referencias clínicas o histopatológicas que hablen de daño renal por depósito de inmunocomplejos en la enfermedad humana. Queda entonces por ver si hay alguna correlación entre la presencia o ausencia de CIC, y de la especificidad de sus componentes, con las manifestaciones patológicas de la enfermedad.

### 2.4. Interferón (IF)

La producción de IF está íntimamente relacionada con el desarrollo intracelular de micro-organismos parásitos, esencialmente los virus. Su actividad biológica (inhibición del desarrollo intracelular de los parásitos) ha sido demostrada en infecciones por *Plasmodium berghei* (180) y *Toxoplasma gondii* (181,182), por lo que es importante



establecer si desempeña algún papel en la infección por *T. cruzi*.

En varios trabajos (183-185) se demostró que el *T. cruzi* es capaz de inducir la producción in vivo de IF en animales de experimentación; si bien no se encontró relación entre los niveles sanguíneos de IF y el curso de la infección (184,185), el tratamiento con IF exógeno podría aumentar la resistencia (186). El empleo de inductores sintéticos para estimular la producción de IF ha dado resultados contradictorios: aumento (187) o no (188) de la resistencia a la infección aguda en ratones de experimentación. Como se ve, la información conocida es insuficiente para establecer exactamente el papel del IF en el desarrollo de la infección chagásica, pero parece dudoso que tenga mucha importancia en el control de la infección.

### 3. PAPEL DE LA INMUNIDAD MEDIADA POR CELULAS (IMC)

Así como fue relativamente sencillo demostrar la presencia de Acs específicos en la enfermedad de Chagas, la demostración de fenómenos de IMC dirigidos contra el *T. cruzi* ha resultado mucho más difícil: tanto en las manifestaciones in vivo como en distintos estudios in vitro, sólo una fracción de los sujetos infectados presenta respuestas de IMC. Recordemos a este respecto que la presencia de chagoma de inoculación (189) y/o de esquizotripánides (190) sólo es evidente en la minoría de los pacientes y que, si bien es relativamente sencillo obtener reacciones de hipersensibilidad inmediata tras la inyección intradérmica de Acs de *T. cruzi* (reacción de Guerreiro Machado), las respuestas cutáneas típicas de hipersensibilidad tardía (HTa) en la enfermedad de Chagas humana son negativas para la mayoría de los autores y sólo alguno de ellos encuen-



tra resultados positivos (191-193). Esta característica fue corroborada cuando se empleó para ensayos de HTa la fracción citoplasmática soluble (CS) de *T. cruzi*: mientras los 38 pacientes estudiados presentaron respuesta inmediata, sólo 3 de ellos dieron respuesta tardía (194).

En animales de experimentación, tanto infectados crónicos como inmunizados con fracciones subcelulares del parásito, la presencia de reacciones de HTa parece ser más constante (195,196) aunque otros investigadores, que no encuentran esta respuesta en los animales en fase aguda de infección, atribuyen la reacción tardía a fenómenos tipo Arthus, es decir, en lugar de una reacción típica de IMC se desarrollaría un fenómeno mediado por complejos Ag-Ac-C asociado a un estado de supresión para los mecanismos celulares (197).

### 3.1. Inhibición de la migración leucocitaria (IML)

Los linfocitos T presensibilizados al ser re-estimulados por el Ag específico producen una serie de factores, las linfoquinas, capaces de ejercer múltiples efectos. Una de ellas, la inhibición de la migración de los leucocitos (LIF), es fácilmente evidenciables in vitro en la prueba de IML, que es aceptada como una demostración de la existencia de reacciones de IMC. La aplicación de esta técnica en los pacientes chagásicos ha dado resultados positivos frente a distintos Ags (194,198-200), aunque hay datos discrepantes: por ejemplo, el empleo de HT y de distintas fracciones subcelulares del parásito permitió evidenciar respuestas positivas en el 60% de los pacientes; sin embargo, la incidencia de positividad era menor entre los cardiopatas (40%) (194). Por el contrario, cuando se usó un extracto dializado del parásito, la incidencia to-



tal fue semejante (61%), pero la reactividad fue significativamente superior entre los cardiópatas (75%) que entre los asintomáticos (200). Un extracto soluble de epimastigotes tratados con glutaraldehído indujo un porcentaje semejante de respuestas positivas (198).

Estos ejemplos bastan para demostrar la variabilidad de los resultados según los Ags empleados y los pacientes estudiados: aunque la existencia de respuestas positivas frente a Ags del *T. cruzi* está claramente limitada a enfermos chagásicos, no todos responden. Es más: estudios longitudinales demostraron que un mismo paciente puede variar su reactividad a lo largo del tiempo (194). La causa de estas diferencias no se conoce, pero demuestran que las reacciones de IMC no son una constante en la enfermedad de Chagas.

En animales de experimentación se utiliza una técnica similar, la inhibición de la migración de los macrófagos peritoneales, que ha dado resultados positivos en conejos (196) y ratones (201-203) infectados. Sin embargo, las reacciones dependen del inóculo infectivo y de la antigüedad de la infección: se hacen positivas entre los 60 y 150 días, según cuál sea el material inoculado (202, 203).

### 3.2. Transformación blástica de linfocitos en cultivo

Esta técnica, como la anterior, se basa en el hecho de que los linfocitos sensibilizados son capaces de reconocer al Ag sensibilizante y reaccionar en forma distinta de los linfocitos vírgenes. En presencia del Ag, los linfocitos inmunes en reposo se desdiferencian a linfoblastos y hay un aumento de la velocidad de síntesis de RNA y proteínas, que culmina en la síntesis de novo de DNA y



mitosis. La estimulación puede evaluarse microscópicamente o, mejor aun, por la incorporación de precursores metabólicos radioactivos, de los cuales el más usado es la timidina tritiada.

La aplicación de esta técnica para la detección de respuestas de IMC anti-*T.cruzi* dio resultados claramente positivos en un alto porcentaje de enfermos chagásicos, independientemente del título de Acs específicos, y de la presencia o ausencia de cardiopatía (192,204,205), de la edad de los pacientes y de los Acs empleados (204,205).

En estudios con ratones infectados se encontró que las respuestas de proliferación linfoide a extractos totales de *T.cruzi* recién se hacen medibles 60 días después de la infección, sin evidencias de que la falta de respuesta en el período anterior se deba a mecanismos específicos de supresión (206). La capacidad de respuesta proliferativa in vitro también fue demostrada en conejos infectados crónicamente con *T.cruzi* (196).

### 3.3. Citotoxicidad mediada por células

El sistema inmune cuenta con diversos mecanismos para lisar células vivas; ya se mencionaron los que involucran a los macrófagos y al sistema C, y debe agregarse que existen al menos otros tres mecanismos para lisar parásitos. Ellos son: 1) citotoxicidad directa (CMC): ejercida por linfocitos T citotóxicos sensibilizados, que reconocen directamente al Ag específico siempre y cuando se presente asociado con Acs de histocompatibilidad del huésped (107); 2) citotoxicidad mediada por anticuerpos (ADCC); ejercida por células presensibilizadas, o no, que se activan por contacto con la célula blanco recubierta por Ac; y 3) actividad NK, mediada por linfocitos NK (por



"natural killer") sobre células blanco en replicación activa, sin necesidad de presensibilización.

Todos estos mecanismos han sido estudiados en la infección por *T. cruzi*:

- 1) CMC: se conoce únicamente una evidencia, y muy indirecta, de la actividad de este mecanismo: la disminución del número de parásitos cuando son cocultivados con linfocitos sensibilizados (207).
- 2) ADCC: actividad repetidamente demostrada. Es efectiva in vitro tanto contra las formas epi (208, 211-213, 217) y tripomastigote (214, 215) como contra células no sanguíneas revestidas de Ag de *T. cruzi* (219) y puede evidenciarse con células efectoras humanas (212-214, 217), de rata (209-211) y de ratones (208, 215, 216, 218).

A diferencia de otros sistemas estudiados, cáncer por ejemplo, en la ADCC anti-*T. cruzi* las células efectoras son fundamentalmente los granulocitos, tanto neutrófilos (211-214, 216, 217, 219), como eosinófilos (209-211, 214, 216, 219) y los monocitos (218), pero no los linfocitos (209, 213, 216). In vitro, este sistema es capaz de destruir hasta el 90% de los parásitos (211, 213, 216, 217), pero su efectividad in vivo aún se desconoce.

- 3) Actividad NK: varios trabajos sugieren que la infección por *T. cruzi* estimula la actividad citotóxica de las células NK; tanto inespecífica, contra células tumorales (220, 221), como específica, contra epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi* (222). Estos resultados son coherentes con la mayor sobrevivencia de ratones infectados cuando son tratados con inductores de IF (166), uno de cuyos efectos conocidos es aumentar la actividad NK (223).

La participación de las células NK en la resistencia a



la infección ha sido demostrada en otras parasitosis (224) y fue sugerida en la tripanosomiasis americana porque el curso de la infección y la sobrevida de ratones "beige", mutantes deficientes en NK, no son alterados por inductores de IF (166).

#### 4. OTRAS EVIDENCIAS DE ACTIVIDAD INMUNE MEDIADA POR CELULAS

De todo lo dicho, se desprende que el sector timo-dependiente del sistema inmune de un huésped infectado puede reaccionar contra los Ags del *T. cruzi*, y los siguientes hechos dan cuenta de la importancia global de esta reactividad in vivo.

##### 1. Falta del sistema T

Tanto en ratones timectomizados (225,226), tratados con suero anti-timocito (227), como genéticamente atímicos (228-230) la infección aguda es más grave: hay mayor parasitemia y mayor número de parásitos tisulares y menor tiempo de sobrevida; además, la depresión del sistema T convierte en letales dosis de parásitos que no lo son en animales normales (230). Idénticos resultados se obtuvieron empleando ratas (227). La demostración de que la memoria inmunológica anti-*T. cruzi* reside en las células T corrobora estos datos (226).

##### 2. Transferencia de inmunidad

La posibilidad de transferir inmunidad contra la enfermedad aguda experimental ha sido muy explorada, usando tanto suero como células de animales inmunizados. Los resultados obtenidos con células hasta ahora no son categóricos: sólo algunos investigadores lograron resultados positivos. Pero esto no es todo: si bien varios autores



obtuvieron protección por transferencia de células esplénicas inmunes totales, tanto en ratas (232) como en ratones (232,233-236), la separación de estas células en las dos grandes subpoblaciones permitió adjudicar la protección a las células B en unos casos (234,236) y a las T en otro (235). Frente a estas aparentes incoherencias se ha propuesto que la inmunidad protectora está mediada por las células B pero requiere la actividad "colaboradora" de las T (236), mecanismo que explicaría la baja capacidad defensiva de los animales timo-deficientes (234).

### 3. Efecto de la inmunodepresión

Las observaciones hechas en animales infectados o pacientes chagásicos tratados con drogas inmunodepresoras también muestran resultados contradictorios.

Así, por ejemplo, los ratones tratados con cortisona durante la fase aguda, hicieron infecciones más graves (237, 238). En la fase crónica, ni el imurán ni la mercaptopurina tuvieron efectos (239), mientras que la cortisona (240), la irradiación y la ciclofosfamida produjeron reagudizaciones (240-243).

En el caso de pacientes chagásicos crónicos, los resultados obtenidos no son concordantes: mientras el seguimiento de un grupo relativamente numeroso de enfermos que, por patología concurrente, han sido tratados con prednisona, ciclofosfamida y/o citostáticos, no mostró alteraciones en la evolución de la infección parasitaria ni signos histológicos de reactivación (244,245), <sup>en</sup> algunos casos aislados con tratamientos semejantes (por ejemplo, citostáticos, corticoides e irradiación, por presencia de linfomas malignos) se favoreció la infección transfusional (246-248) o reagudizó la infección chagásica (193). En varios



casos se llegó a la encefalitis aguda sin cardiopatía concomitante (247,248); y los datos histológicos mostraron severos compromisos infecciosos (246). La interpretación de estas observaciones, aparentemente discordantes, sobre la reagudización de la forma crónica de la enfermedad no es sencilla, sobre todo porque, hasta el presente, no se conoce acabadamente el efecto de cada uno de estos tratamientos sobre la modulación de la respuesta inmune, aunque sí se sabe que dicho efecto puede variar enormemente según la dosis, el tiempo de tratamiento, el estado previo del sistema inmune respecto del Ag, etc. Por tanto, será necesario esperar más información para poder interpretar válidamente los resultados recién citados.

#### 5. INMUNIDAD CONCOMITANTE

Con lo antedicho queda demostrado que el sistema inmune tiene un papel defensivo activo en la infección por el *T. cruzi*. Esta actividad, si bien no logra eliminar totalmente al parásito del huésped, se confirma por la existencia de la así llamada "inmunidad concomitante", que se refleja en una resistencia relativa a nuevas invasiones parasitarias. Este fenómeno ha sido demostrado en infecciones experimentales (249-252), aunque hay resultados en contrario (253). De hecho, no se conocen casos de infección humana donde se repitan naturalmente episodios agudos en un mismo individuo, aunque queda por saber todavía si las reinfecciones pueden o no aumentar el riesgo de desarrollar manifestaciones patológicas en la enfermedad crónica.



### EFFECTO DE LA INFECCION CHAGASICA SOBRE EL SISTEMA INMUNE

La mayoría de los investigadores coincide en que la fase aguda de la tripanosomiasis americana experimental conlleva una depresión inespecífica de la respuesta T, mientras que no observan alteraciones durante la fase crónica (254, 255). Para algunos autores, la depresión se debería a una sobreestimulación de células supresoras (256). Otros la atribuyen a una condición anérgica inducida por el parásito, equivalente a una desensibilización (257, 258), que es evidenciable o no in vitro, según las condiciones experimentales (259). También se ha propuesto que la infección aguda reduce cuantitativa y funcionalmente el sistema T (206, 242, 260) probablemente en las subpoblaciones colaboradora y/o respondedora (206), y que la célula implicada en esta supresión pertenecería a la población adherente (261); además, se atribuye al *T. cruzi* capacidad para inhibir "per se" la blastogénesis durante los estadios tempranos de la activación linfocitaria (262).

Por fin, otros investigadores han demostrado que la activación y expansión de células supresoras específicas contra Ags del *T. cruzi* puede no ir acompañada de alteraciones en la respuesta a Ags no relacionados (236).

Estas contradicciones podrían explicarse por las diferentes cepas de parásitos y de ratones utilizadas, como lo sugiere el hallazgo, o no, de supresión de la respuesta celular según la cepa de ratones, aun cuando la parasitemia y mortalidad fueran semejantes (263).

Otros resultados conocidos en modelos experimentales demuestran la estimulación de la actividad fagocítica inespecífica de las células mononucleares (264, 265) y de la liberación al medio de un factor no-proteico con activi-



dad anticomplementaria (172).

Las únicas observaciones a este respecto en pacientes chagásicos se refieren a la fase crónica de la enfermedad, y la opinión generalizada es que no hay alteraciones significativas en el número de linfocitos T (199), ni en la respuesta a mitógenos (192,266), ni en otras manifestaciones funcionales de actividad T (204). Sólo un autor halló parámetros celulares ligeramente alterados (267).

En cuanto a la respuesta humoral, varios trabajos han mostrado que el *T. cruzi* puede activar en forma inespecífica a clones de linfocitos B no pre-comprometidos con la respuesta específica al parásito; por ejemplo, la respuesta por Acs a Ags eritrocitarios heterólogos está aumentada en animales infectados (268-271). Sin embargo, otros trabajos han mostrado lo contrario: respuesta disminuida (272,273). Es muy posible que estas discrepancias se deban al momento en que se hace la inmunización con eritrocitos en relación con la fase de la enfermedad (274), pero también es posible que el efecto sobre la respuesta a los glóbulos rojos se deba a una reacción cruzada, ya que en distintas cepas de ratones habría correlación entre la capacidad de respuesta primaria a eritrocitos de carnero y la resistencia a la infección por *T. cruzi* (275).


Con respecto a la realidad o no de una activación policlonal de los linfocitos B por el *T. cruzi* en los seres humanos infectados, debe recordarse la heterogeneidad de resultados obtenidos al cuantificar el contenido de  $\gamma$ -G y de las distintas Igs. El único trabajo experimental conocido, con células humanas, mostró respuestas humorales muy reducidas ante distintos Ags (276).

En contraste con esta discutida activación policlonal B, varios autores mostraron que la infección aguda experimental se acompaña de una disminución de la respuesta



humoral a Ags no relacionados (275,277). Algunos investigadores atribuyen esta disminución a la producción de un factor sérico supresor (SSS) inducido por la infección cuya actividad puede ser mediada por células macrofágicas y alcanzar a Ags T-dependientes y T-independientes (278). Este factor ha sido purificado y caracterizado estructuralmente y sería capaz de actuar tanto directamente como por inducción de linfocitos supresores, capacidad ésta demostrada sobre células esplénicas o de ganglios linfáticos de animales normales (279). La actividad supresora debida directamente al SSS está presente en distintas cepas de ratones y parece controlada genéticamente por el complejo mayor de histocompatibilidad (280); su efecto es claramente distinto del de las células supresoras y lo precede en el tiempo (281), y disminuye la actividad de células T colaboradoras (283), lo que resulta en una hiporreactividad de los linfocitos T que se extiende a la respuesta humoral (278,283).

Cuando se estudió simultáneamente la respuesta humoral a Ags autólogos y alogeneicos se comprobó que la reactividad es heterogénea, que la supresión puede afectar diferencialmente a las distintas respuestas y que dependería de la susceptibilidad de la cepa de ratones empleados (284).





REACCIONES AUTOINMUNES EN LA INFECCION POR TRYPANOSOMA  
CRUZI

Desde hace más de 40 años se sospecha que el *T. cruzi* puede inducir en el huésped mecanismos inmunes dirigidos contra Acs propios y que esta autoagresión estaría vinculada con la patogenia de la enfermedad de Chagas (285).

La primera evidencia clara de la existencia de Acs dirigidos contra tejidos normales fue la detección, en el suero de pacientes chagásicos, de Igs que, por técnicas de inmunofluorescencia, mostraban reacciones contra endocardio, intersticio, endotelio vascular y membrana plasmática de células de miocardio y músculo esquelético de rata. Por esta reactividad se los definió como Acs EVI (82, 286). Este y trabajos posteriores demostraron que el factor EVI presenta reactividad cruzada con *T. cruzi* y *T. rhodiense* (287), alta prevalencia entre los infectados chagásicos (288,289), y que su presencia<sup>se</sup> correlacionaría con la de lesiones histopatológicas en músculo esquelético (290). Se vio también que el factor EVI es detectable en las etapas tempranas de la infección (291) y que su presencia en el suero no es afectada sensiblemente por el tratamiento con tripanomicidas (292), a diferencia de los Acs anti-tripanosoma. Trabajos recientes han puesto en evidencia que la imagen EVI reúne dos reactividades de distinta especificidad: una imagen extracelular de actividad heteróloga y una imagen intracelular de reactividad homóloga, probablemente dirigida contra la miosina (293). Tal vez por este motivo estos Ac, así como otros análogos encontrados en el suero de pacientes con distintas patologías, por ejemplo, fibrosis endomiocárdica (294), o aun en sujetos sanos de raza negra (295), no es indicativa ni



tiene valor pronóstico de lesiones orgánicas (289,296, 297). La causa de la aparición de este Ac, así como de otros Acs con actividad contra células de la vaina de Schwann de nervios periféricos (Ac NP), también descritos en la enfermedad de Chagas, tanto aguda como crónica (298,299), es discutida; pero puede razonablemente pensarse que aparecen como consecuencia directa o indirecta de la ruptura de células del huésped por la invasión parasitaria o bien, según postulan sus descubridores, por la presencia de determinantes antigénicos comunes al parásito y a células somáticas del huésped. Esta última hipótesis estaría avalada por hallazgos recientes que evidencian la existencia de determinantes antigénicos comunes al *T. cruzi* y, por un lado, a ciertas poblaciones de neuronas de rata (277,300) y, por el otro, al retículo sarcoplasmático de músculo de una gran variedad de especies que incluyen desde los peces hasta los primates (301, 302). De todas maneras e, independientemente de su origen y de su falta de relación con las manifestaciones patológicas de la enfermedad de Chagas, la existencia de actividad EVI y NP es un hecho, corroborado no sólo por las observaciones citadas sino también porque ha sido detectado en animales muchos años después de la infección (303) y porque su producción fue inducida en forma experimental en conejos empleando diversos inmunógenos: corazón, músculo o riñón heterólogo aislados o combinados con Acs de *T. cruzi* (304). Además, los sueros EVI-positivos han demostrado poseer actividades características en estudios de farmacología cardíaca: actúan como agonistas  $\beta$ -adrenérgicos sobre aurículas aisladas de rata (305) por un mecanismo sólo parcialmente dilucidado que involucra la estimulación reversible de la captación extraneuronal de catecolaminas (306) y la modificación de los flujos de  $\text{Ca}^{++}$



(307,308). En estudios recientes se ha demostrado que estos mismos efectos se logran utilizando linfocitos no-T normales como "efectores" de la actividad mediada por las inmunoglobulinas EVI (309).

También se ha podido demostrar que la infección con *T. cruzi* induce, tanto en el hombre como en animales de experimentación, la aparición de Acs anti-laminina, una glicoproteína constitutiva de las membranas basales; estos Acs reaccionan también con tripomastigotes y amastigotes pero no con epimastigotes de *T. cruzi* (310). La importancia clínica de este Ac puede ser muy grande pero aún no ha sido demostrada. Por otra parte, las células linfoides de organismos parasitados también reaccionan con tejidos normales: se pegan a cortes de miocardio y pueden agredir la superficie tisular (311) y destruir in vitro células cardíacas, parasitadas o no, especialmente si los linfocitos provienen de una infección aguda (312,313). Por ensayos de IML se demostró que los leucocitos de pacientes chagásicos reaccionan frente a extractos cardíacos (200,314), aunque otros autores encuentran resultados negativos frente a extractos de corazón y de músculo esquelético, y positivos frente a hígado, riñón y cerebro (315). Por proliferación de linfocitos en cultivo también se ha demostrado reacción anti-corazón, frente a tejido de rata, en pacientes con y sin miocardiopatía (266).

En resumen, parece haber evidencias abundantes de la capacidad de los pacientes chagásicos para montar reacciones inmunes, tanto sea por Acs como por células, contra estructuras antigénicas de órganos normales; pero ningún autor pudo encontrar correlación entre cualquier tipo de respuesta y presencia o ausencia de manifestaciones



patológicas específicas de la enfermedad, como tampoco demostrar alguna especificidad de tejido en dichas reacciones que, in vitro, parecen alcanzar a órganos usualmente no comprometidos en las formas crónicas de la enfermedad de Chagas.

#### RELACION HUESPED-PARASITO

Todo lo dicho sugiere que después de la infección se establece una relación bidireccional entre huésped y parásito en la cual, además de los mecanismos de escape parasitario, intervienen factores genéticos, ambientales y de regulación.

#### 1. FACTORES GENETICOS Y AMBIENTALES

##### 1.1. Del huésped

Numerosos trabajos ya mencionados demuestran que la resistencia a la infección aguda en animales de experimentación depende del contenido genético del huésped; por ejemplo, la resistencia está asociada a la capacidad genética para sintetizar Acs (159), para montar respuestas celulares (228,230), para ejercer actividad NK (187) y para producir linfoquinas (96).

Cuando se encuentran cepas de ratones sensibles y resistentes a la infección aguda -evaluadas por parasitemia y mortalidad- es evidente la influencia genética, aunque todavía no se ha determinado cuáles y cuántos son los genes responsables. Para algunos, tanto la resistencia como la parasitemia dependen de un control multigénico que, en el caso de la parasitemia, es independiente del CMH (316). Otros trabajos explican el amplio espectro de sensibilidad a la infección como el resultado de la interacción de factores genéticos (múltiples y sólo parcialmente ligados



al CMH) y de la actividad del sistema inmune (317,318), a los que se unen diferencias metabólicas, tales como la concentración cardíaca y cerebral de acetilcolin-transferasa durante la infección (319). Por fin, también se ha demostrado que la expresión de genes que controlan ciertas manifestaciones autoinmunes incrementa notablemente la sensibilidad a la infección aguda (320).

Por lo tanto, la relación entre sensibilidad a la infección y composición genética del huésped es un hecho, aunque los datos mencionados sólo deben tomarse como indicativos, dado que pueden hasta invertirse según la cepa del parásito empleada (321).

En la enfermedad humana no se ha podido correlacionar la infección ni la patología con factores genéticos; es más, aún no se sabe si las diferencias geográficas en la presentación de la enfermedad se deben a características genéticas de la población o del parásito, o a factores independientes de éstas, como la nutrición. Un dato ilustrativo del efecto ambiental es la influencia del "stress" en el desencadenamiento de ciertas manifestaciones patológicas (41).

### 1.2. Del parásito

En este terreno las cosas tampoco están suficientemente aclaradas, pero debemos considerar algunos hechos ya demostrados o planteados.

Está claramente probado que existe una alta variabilidad genética intraespecie en el *T. cruzi*. Por ejemplo, hay diferencias de hasta un 30% en el contenido total de DNA no sólo en distintas cepas sino también entre clones de parásitos derivados de una misma cepa (322). Esta variabilidad estructural está acompañada de diferencias fun-



cionales intercepas e interclones, como por ejemplo, las demostradas en tropismo tisular (21), en la infectividad de macrófagos (19,93-96), en el perfil de productos de clivaje del DNA por endonucleasas de restricción (323), y en el tiempo de duplicación (324). Es evidente que el *T. cruzi* debe de contar con un repertorio genético muy amplio: además de sucesivas metamorfosis, debe ser capaz de llevar vida libre e intracelular, debe invadir distintos huéspedes, adaptarse metabólicamente a sus ambientes y evadir los mecanismos de defensa de éstos. Ejemplos de esta variabilidad adaptiva son: la distinta capacidad de los tripomastigotes de una misma cepa para infectar macrófagos, según provengan de circulación periférica, de cultivo de células o de cultivo axénico (92,93) y el "factor antifagocítico", presente exclusivamente en las formas circulantes del *T. cruzi* (96).

## 2. FACTORES REGULATORIOS

La existencia de mecanismos regulatorios en toda respuesta inmune es un hecho bien conocido. Dicha regulación se puede producir en distintos momentos de proceso: desde la captación y presentación de los Ags por los macrófagos hasta la instancia efectora en sus diversas expresiones.

Muy poco se sabe de este tema en la infección chagásica: ya mencionamos que la infección aguda experimental es acompañada de una disminución de la respuesta tanto celular como humoral a Ags no relacionados con el *T. cruzi*, y también mencionamos diversos factores que influyen en la relación entre el parásito y los macrófagos. Los siguientes pasos de la respuesta inmune han sido menos estudiados, sobre todo en la infección crónica pero, por ejemplo, está claramente demostrada la existencia de células T co-



laboradoras ("T<sub>h</sub>") específicas contra el parásito desde el día 10 post-infección (325), y la presencia de células T supresoras específicas para reacciones de HTa anti-*T. cruzi* en el bazo de animales crónicamente infectados (326).

Estos datos aislados indican que, en la enfermedad de Chagas, están presentes distintos mecanismos reguladores que, si bien no impiden la existencia de reacciones anti-*T. cruzi*, controlan su potencia en un nivel evidentemente insuficiente para eliminar al parásito.

### 3. MECANISMOS DE ESCAPE

Además del nivel funcionalmente insuficiente de respuesta inmune, parece evidente que el *T. cruzi* ha desarrollado, a lo largo de su evolución, ciertos mecanismos de "escape" que le permiten sobrevivir en un ambiente biológicamente hostil. Algunos de estos mecanismos han sido descubiertos y están siendo estudiados.

Uno de los aspectos que más llaman la atención es la capacidad de los tripomastigotes para sobrevivir, diferenciarse y replicarse dentro de los macrófagos, células esencialmente líticas para todo aquello que ose invadir las y hasta tocarlas. Se ha propuesto que algunos de los parásitos fagocitados logran resistir la actividad proteolítica de las enzimas lisosomales (aunque no se ha postulado cómo lo harían) y escapar del fagolisosoma al citoplasma (94,106,318), inclusive en los muy eficientes macrófagos activados (327).

Otro hecho notable es la existencia de formas circulantes en organismos con Acs potencialmente líticos y complementemia normal. En este caso, el escape podría resultar del fenómeno de "capping" (73-76), que ya analizamos



anteriormente; pero debe tenerse en cuenta que, en general, este fenómeno no es, in vivo, lo suficientemente rápido como para proteger al parásito de la activación del C.

Se ha descrito un tercer mecanismo de escape, la "fabulación": ciertas cepas de *T. cruzi* tienen la capacidad de producir y liberar enzimas capaces de clivar las Igs pegadas a su superficie y así eliminar sus fragmentos Fc, que son los que fijan al C. Aunque este fenómeno no es común a todas las cepas, se ha demostrado que formas circulantes pueden llevar en su cubierta fragmentos Fab de Igs (139).

Finalmente, un fenómeno muy interesante recientemente descrito es que los sueros de enfermos chagásicos facilitan la penetración de parásitos en células parenquimatosas en cultivo (99), fenómeno que ya había sido descrito para macrófagos (93) y que no pudo ser corroborado por otros autores (328).

Como se ha revisado precedentemente, a pesar de que el sistema inmune ejerce un control sobre el parásito durante la infección, el *T. cruzi* puede escapar del sistema inmune y, más aun, utilizar "pro domo suo" algún mecanismo originalmente agresivo; sólo el tiempo y, por supuesto, el trabajo científico, dirán si estos mecanismos son los únicos y cuál podría ser la forma de contrarrestarlos.



### OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo es estudiar algunos mecanismos relacionados con la regulación de la respuesta inmune al *Trypanosoma cruzi* en los enfermos chagásicos; según el siguiente proyecto:

- 1- investigar la respuesta inmune celular al *T. cruzi* en relación con distintos antígenos parasitarios y con el curso de la enfermedad;
- 2- investigar la existencia de mecanismos humorales y/o celulares que sean capaces de modificar esa respuesta, y su relación con distintos antígenos del parásito y/o con el curso de la enfermedad;
- 3- investigar la existencia de fenómenos de inmunidad mediada por células en la cardiopatía chagásica crónica, y su relación con los mecanismos regulatorios de la respuesta inmune al *T. cruzi*.



### TESIS

Se postula que la persistencia de la infección chagásica es consecuencia de que, en los individuos infectados por el *T. cruzi*, la respuesta inmune celular está regulada a un nivel insuficiente para rechazar al parásito; y que la existencia de pacientes con diferente grado de compromiso clínico está vinculada con la existencia de distintos niveles de regulación de la respuesta inmune.



## CAPITULO 2

DESARROLLO DE UNA TECNICA PARA EL  
AISLAMIENTO DE CELULAS INMUNOCOMPETENTES



## INTRODUCCION

Para estudiar in vitro la respuesta inmune celular en los sujetos infectados con el *Trypanosoma cruzi* es necesario aislar células inmunocompetentes de su torrente sanguíneo.

Los estudios parasitológicos demostraron parásitos circulantes por lo menos en el 50% de los enfermos chagásicos crónicos (329); los parásitos pueden, entonces, aparecer contaminando los aislamientos de células inmunocompetentes. Esta contaminación ha sido documentada (330, 331), y puede distorsionar los fenómenos en estudio y afectar su evaluación; no sólo porque los parásitos pueden proliferar sino también porque incrementarían en cantidades desconocidas las usualmente muy bajas dosis de antígenos empleadas en este tipo de técnicas in vitro. Más aun, algunas formas de *T. cruzi* pueden incorporar timidina (332) y esto distorsionar aun más el ensayo si se emplea la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina para evaluar la respuesta inmune.

Por lo expuesto, se consideró necesario, en primer lugar, desarrollar una técnica que permitiera obtener células hábiles para estudios in vitro de inmunidad que, al mismo tiempo, no estuvieran contaminadas con formas circulantes de *T. cruzi*.



## MATERIALES Y METODOS

### 2.1. Suspensiones celulares

2.1.1. Se recoge sangre periférica en tubos con anticoagulante (Heparina-Liquemine ROCHE - 50 U/ml) y dextrán (Dextrán 70 - ROUX OCEFA - 6% en NaCl 0.15M, 1:4 v/v) y se deja sedimentar 60 min en posición inclinada 20°. Se separan, entonces, el plasma sobrenadante y la capa de células blancas que se encuentran en la interfase para ser escurridas sobre una solución de Ficoll-Hypaque (FH) (Ficoll PM 400.000 9%: Hypaque 33.9%; 24:10; densidad 1.077 g/ml), en una relación plasma: FH 5-7:2 aproximadamente. Se centrifuga 40 min a 400 x g y se procede luego a aspirar cuidadosamente la interfase, donde han sido retenidas las células mononucleares (333). Estas células son lavadas tres veces con medio mínimo para cultivo (MEM) (MEM N° F-14, GIBCO, New York, E.E.U.U.) y resuspendidas en MEM. A continuación, se procede a contar las células empleando azul de tripan al 2%, para evaluar simultáneamente la viabilidad, y se ajusta consecuentemente la concentración según necesidad.

2.1.2. La misma técnica fue empleada con sangre de ratones Rockland, machos de 30 días de edad, infectados 4-6 días antes con  $3 \times 10^5$  tripomastigotes de *T. cruzi*, cepa Tulahuén, obteniéndose en la interfase una suspensión celular con leucocitos y parásitos.

2.1.3. Las suspensiones celulares obtenidas según 2.1.1. y 2.1.2. fueron mezcladas para obtener una concentración final de  $5-6 \times 10^6$  tripomastigotes en 1 ml de MEM. Estas suspensiones fueron depositadas cuidadosamente sobre gradientes de densidad.



## 2.2. Gradientes de densidad

### 2.2.1. Preparación

Se emplearon las siguientes soluciones: SSC (sacarosa 0.25 M,  $\text{CaCl}_2$  3 mM) y FH en SSC (según composición antes citada). Con ellas se prepararon gradientes continuos de densidad, empleando una bomba peristáltica (LKB tipo A, LKB Prod., Suecia) de aproximadamente 6 cm de altura y 12 ml de volumen final. Los gradientes tenían una densidad de 1.077 g/ml en el fondo del tubo y subían hasta 1.034 g/ml en la superficie. Esta distribución de densidades fue controlada durante la preparación de los gradientes y comprobada al finalizar los experimentos.

También se prepararon gradientes discontinuos depositando sucesivamente 2 ml de diferentes combinaciones de SSC y FH con densidades de 1.077, 1.060 y 1.051 g/ml respectivamente.

### 2.2.2. Tratamiento

Los gradientes, y las suspensiones celulares depositadas sobre ellos, fueron centrifugados 40 min a  $400 \times g$  ( $4^\circ\text{C}$ ).

### 2.2.3. Fraccionamiento

Los gradientes continuos fueron fraccionados en 12 alícuotas iguales desde la superficie hasta el fondo. Los gradientes discontinuos fueron fraccionados en 7 alícuotas tomando el sobrenadante, todas las fases e interfases y el fondo.

### 2.2.4. Análisis

De cada una de las fracciones se determinó el contenido proteico, siguiendo la técnica de Lowry et al (334), y el



contenido celular, contando en un hemocitómetro alícuotas mezcladas con azul de tripán 2%.

### 2.3. Ensayo de inoculación

#### 2.3.1. Preparación del inóculo

Se sangraron ratones BALB/c, de 60 días de edad, infectados como en 1.b. La sangre fue diluida 1:2 con PBS ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  12,3mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  47,5mM NaCl 0.15M, pH 7.2) y depositada sobre un gradiente bifásico de densidad preparado con 2 capas, de 3 ml cada una, de FH con densidades 1.077 y 1.060 g/ml respectivamente, en tubos de nitrato de celulosa de 16 mm x 75 mm.

Los tubos fueron centrifugados 40 min a 400 x g (4°C) y el sobrenadante obtenido fue descartado.

La interfase superior fue recuperada cuidadosamente empleando una pipeta Pasteur. Esta interfase de baja densidad (IBD) contenía cantidades equivalentes de leucocitos y tripomastigotes de *T. cruzi*, que fueron lavados 2 veces con MEM y resuspendidos a una concentración final de  $1,5 \times 10^4$  leucocitos y  $1,5 \times 10^4$  parásitos por mililitro.

La interfase de alta densidad (IAD) fue recuperada por medio una aguja y jeringa a través de la pared del tubo, pinchando justo por debajo de la interfase y aspirando lentamente. A la observación microscópica, esta suspensión no mostró parásitos, por lo que fue lavada 2 veces y resuspendida en MEM a una concentración de  $1.0 \times 10^6$  células/ml.

#### 2.3.2. Inoculación y seguimiento

Alícuotas del contenido de ambas interfases (0.1 ml de IBD ó 0.2 ml de IAD) fueron inoculadas en ratones BALB/c de 3 días de edad por vía subcutánea.



La presencia o ausencia de parasitemia fue controlada diariamente por observación microscópica de muestras de sangre obtenidas por corte de cola desde el día 3 hasta el día 13 post-inoculación (pi). El día 15 pi los animales inoculados con la suspensión de IAD fueron estudiados por xenodiagnóstico, alimentando sobre cada uno de ellos 10 ejemplares de *Triatoma infestans* en tercer estadio (329). El día 32 pi los animales del grupo IAD fueron sangrados y, en los sueros individuales, se exploró la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* por ensayos de doble difusión en placas (335), empleando como antígeno homogenato total de *T. cruzi* (68), y de inmunofluorescencia indirecta (IFI) sobre epimastigotes de cultivo (336).

#### 2.4. Cultivo de linfocitos

##### 2.4.1. Aislamiento de células

Se obtuvo plasma rico en leucocitos de donadores sanos según se describiera en 2.1.a. Las células mononucleares periféricas fueron aisladas usando paralelamente dos técnicas: a) una columna de FH como la descrita en 2.1.a., y b) un gradiente discontinuo con dos fases, de 1.077 y 1.060 g/ml de densidad respectivamente, preparado como en 2.1.

En el primer caso se recogieron las células sobrenadantes al FH (linfocitos totales = LT) y, en el segundo, las células de la interfase que se encontró entre las dos capas de FH (linfocitos densos = LD).

Todas las células fueron lavadas dos veces con MEM, resuspendidas en medio para cultivo RPMI suplementado (RPMI-1640, GIBCO, New York, E.E.U.U., con 80 mg/l de gentamicina, Gentamina 400, ESSEX, Arg.), contadas con azul de tripán y su concentración ajustada.



#### 2.4.2. Cultivo propiamente dicho

Las células fueron cultivadas en tubos de polipropileno (10 mm x 35 mm, POLYSTOR N°8, Buenos Aires) triplicados. Cada cultivo consta de  $2 \times 10^5$  células en 200  $\mu$ l de volumen final con 20% de suero humano normal AB, Rh positivo, inactivado por calentamiento (30 min a 56°C). Para evaluar la respuesta linfoproliferativa inespecífica se cultivó en presencia de fitohemaglutinina (PHA-P, DIFCO, E.E.U.U.) a una concentración final de 15  $\mu$ g/ml durante 72 hs en una atmósfera de aire con 5% de CO<sub>2</sub>. Tres horas antes de cosechar las células se agregó a todos los cultivos 1.0  $\mu$ Ci de [<sup>3</sup>H]-timidina (New England Nuclear, act. esp. 20 Ci/mmol, Massachusetts, E.E.U.U.).

#### 2.4.3. Cosecha de células

Las células de cultivo fueron aisladas utilizando un cosechador automático multi-canal (London Miniharvester, Londres, Gran Bretaña) por aspiración con corriente de vacío y retención sobre papel de filtro con fibra de vidrio (Whatman GF/A).

#### 2.4.4. Evaluación del cultivo

El papel con material retenido fue cortado y colocado en viales de centelleo. Se agregó a cada vial 2 gotas de solubilizador de tejido (NCS, Amersham Searte, Bucks, Gran Bretaña) y, 18 horas después, 3 ml de solución centelleadora (PPO 5 g, Dimetil POPOP 250 mg, tolueno 1 litro). La emisión radioactiva de cada vial fue cuantificada en un contador Unilux II-A (New England Nuclear, Massachusetts, E.E.U.U.) leyendo 5 min con 2% de error.



## RESULTADOS Y DISCUSION

### Gradientes de densidad

La Tabla 1 presenta un resultado típico de la centrifugación sobre gradiente continuo de densidad. Todos los tripomastigotes de *T. cruzi* fueron encontrados entre 1.051 y 1.057 g/ml; en 4 de 5 experimentos no se encontraron parásitos por debajo de 1.055 g/ml. Los leucocitos mononucleares se distribuyeron entre 1.046 y 1.080 g/ml, esto es, a lo largo de todo el gradiente; en el caso ilustrado, el 86% y en otros hasta el 90% de las células linfoides aparecieron a densidades superiores a 1.060 g/ml, o sea, libres de parásitos.

Resultados semejantes se encontraron con los gradientes discontinuos (ver Tabla 2).

En todos los casos, la viabilidad de los linfocitos fue superior al 95%, y la recuperación del 60-80%, es decir, equivalente a la que se obtiene usualmente empleando monocapas de FH (333).

Los parásitos presentaban una morfología normal y buena movilidad, excepto en algunas fracciones de alta densidad donde se encontraron formas inmóviles que recuperaron su movilidad cuando se disminuyó la densidad por agregado de agua.

El contenido proteico de cada fracción guardó relación con el número de células.

### Ensayo de inoculación

Este experimento fue diseñado para investigar la presencia o ausencia de tripomastigotes de *T. cruzi* en las zonas de mayor densidad. Se operó, entonces, con un gradiente discontinuo con dos fases de 1.077 y 1.060 g/ml



respectivamente. Sobre este gradiente se centrifugó sangre de un ratón infectado y las dos interfases obtenidas fueron inoculadas en ratones recién nacidos, es decir, muy sensibles a la infección.

Como muestra la Tabla 3, los animales inoculados con la interfase de baja densidad desarrollaron una infección aguda y fallecieron rápidamente. En cambio, los animales inoculados con la interfase de alta densidad sobrevivieron hasta su sacrificio el día 32 pi sin parasitemia ni anticuerpos específicos detectables.

#### Respuesta proliferativa de células mononucleares de alta densidad

En estos ensayos se comparó la capacidad funcional de las células aisladas de gradientes bifásicos con las que se obtienen siguiendo la técnica tradicional sobre una columna de FH. Para ello se empleó un ensayo de transformación blástica empleando PHA como mitógeno.

La Tabla 4 muestra que ambos métodos de aislamiento permiten purificar células con una capacidad blastomitogénica equiparable.



### CONCLUSIONES

El aislamiento de linfocitos viables no contaminados con formas circulantes de *T. cruzi* puede obtenerse con dos procedimientos distintos: 1) la lisis selectiva de los parásitos, y 2) la separación físico-química de ambos tipos celulares. El primer procedimiento tiene algunas desventajas: por ejemplo, que el tratamiento lítico afecte funcionalmente a los leucocitos, o bien que los productos de la lisis del parásito no sean totalmente eliminados aun cuando se laven las células exhaustivamente que, por otra parte, pueden resultar "pulsadas" in vitro por componentes antigénicos del parásito que contacten o queden adheridos a los monocitos y/o linfocitos durante esta etapa. La separación no destructiva es, entonces, la alternativa recomendable.

El método de centrifugación y separación empleando gradientes de densidad carece de todos los inconvenientes arriba mencionados: ni los linfocitos ni los tripomastigotes son dañados durante la separación, se obtiene una población de células mononucleares pura y no estimulada sin control.

La pérdida del 10-20% de los linfocitos, porque su densidad equivale a la de los tripomastigotes, no parece afectar la capacidad de dar respuestas blastomitogénicas in vitro, aunque no puede asegurarse si se está descartando una muestra al azar o poblaciones celulares funcionalmente específicas.



Tabla 1

DISTRIBUCION DE LINFOCITOS HUMANOS Y TRIPOMASTIGOTES DE  
*TRYPANOSOMA CRUZI* EN GRADIENTES CONTINUOS DE DENSIDAD

Fracción	$\delta$ (g/ml)	Células Mononucleares (%)	Tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> (%)	Proteínas (%)
1	1.037	2.2	18.1	1.9
2	1.046	1.3	0	1.5
3	1.050	1.0	36.8	1.7
4	1.054	1.8	25.4	2.4
5	1.057	3.5	19.7	5.5
6	1.060	3.8	0	6.5
7	1.063	6.4	0	6.4
8	1.065	7.6	0	7.7
9	1.068	7.9	0	7.6
10	1.071	25.0	0	19.8
11	1.077	27.5	0	19.2
12	1.079	12.0	0	16.4



Tabla 2

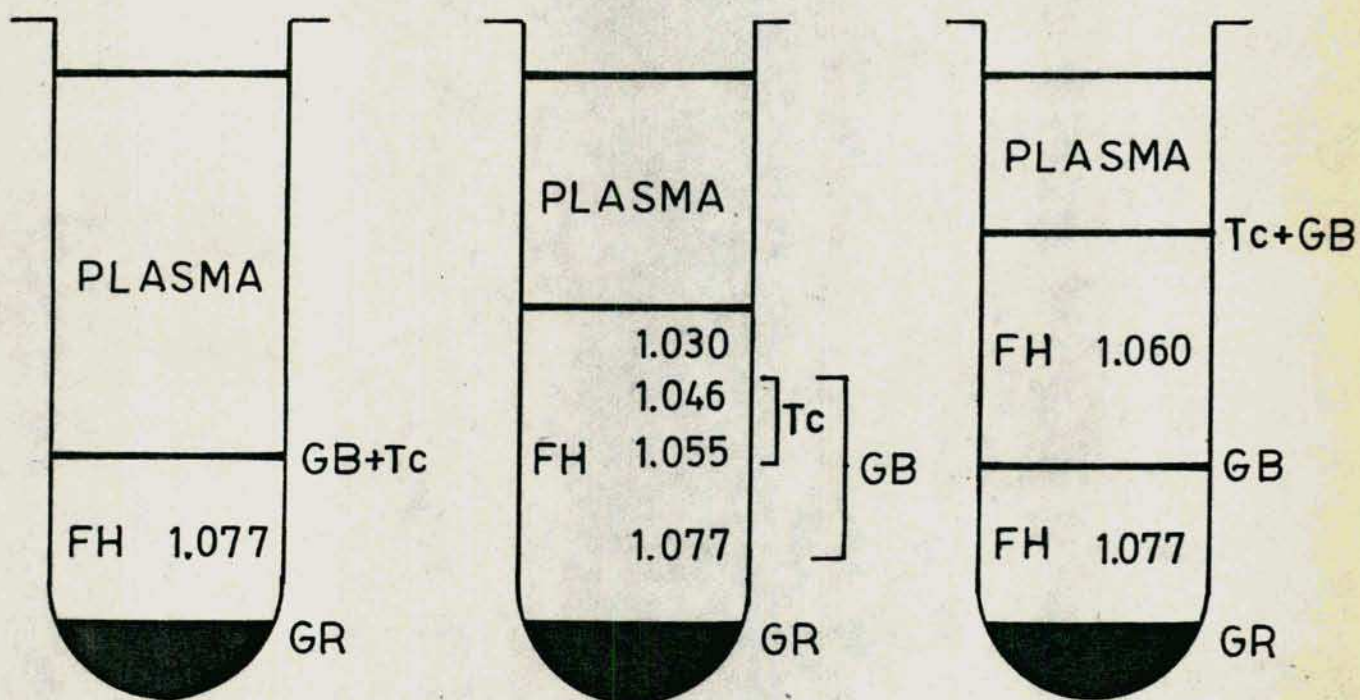
DISTRIBUCION DE LINFOCITOS HUMANOS Y TRIPOMASTIGOTES DE  
TRYPANOSOMA CRUZI EN GRADIENTES DISCONTINUOS DE DENSIDAD

Fracción	$\delta$ (g/ml)	Células Mononucleares (%)	Tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> (%)	Proteínas (%)
1	1.037	7.8	28.1	3.4
2	1.051	9.4	71.9	14.0
3	1.060	10.4	0	13.9
4	1.060	12.4	0	15.1
5	1.068	7.5	0	8.7
6	1.077	26.4	0	21.8
7	1.079	26.1	0	23.1



Figura 1

DISTRIBUCION DE GLOBULOS BLANCOS HUMANOS (GB) Y  
TRIPOMASTIGOTES DE *TRYPANOSOMA CRUZI* (Tc) EN  
GRADIENTES DE DENSIDAD DE FICOLL HYPaque (FH)



GR = glóbulos rojos



Tabla 3  
 INOCULACION DE RATONES LACTANTES  
 CON CELULAS DE BAJA Y ALTA DENSIDAD

	Interfase de baja densidad	Interfase de alta densidad
Número de ratones	9	5
Inóculo/ratón	1500 GB, 1500 TC	$2 \times 10^5$ GB
Parasitemia	positiva desde el día 8 pi	siempre negativa
Muerte	entre días 11 y 13 pi	ninguna
Xenodiagnóstico	no efectuado	negativo el día 15 pi
Anticuerpos anti- <i>T. cruzi</i>	no efectuado	negativo el día 32 pi

GB = glóbulos blancos

TC = *Trypanosoma cruzi*

pi = post-inoculación



Tabla 4

## RESPUESTA PROLIFERATIVA DE LINFOCITOS DENSOS

Dato	Estimulante	Linfocitos totales	IE*	Linfocitos densos**	IE
		cpm		cpm	
1	-	1471 $\pm$ 128***	55	1640 $\pm$ 533	46
	PHA	80990 $\pm$ 12380		75186 $\pm$ 8021	
2	-	2047 $\pm$ 445	86	1533 $\pm$ 449	106
	PHA	176676 $\pm$ 14059		162643 $\pm$ 11457	
3	-	740 $\pm$ 52	125	1116 $\pm$ 166	90
	PHA	91624 $\pm$ 1725		100049 $\pm$ 2319	
4	-	412 $\pm$ 52	200	770 $\pm$ 81	116
	PHA	82617 $\pm$ 4559		89368 $\pm$ 3088	
5	-	1016 $\pm$ 20	63	431 $\pm$ 64	169
	PHA	63647 $\pm$ 3267		72997 $\pm$ 3219	

\* IE = Indice de estimulación: cpm con antígeno/cpm sin antígeno

\*\* Linfocitos humanos con densidad  $> 1.060$  g/m

\*\*\*  $\bar{x} \pm SD$



CAPITULO 3

EVALUACION DE LA RESPUESTA INMUNE  
CELULAR EN ENFERMOS CHAGASICOS CRONICOS



## INTRODUCCION

En el Capítulo 1 hemos presentado información que demuestra, fuera de toda duda, que los Ags del *T. cruzi* son capaces de estimular reacciones específicas del sistema inmune tanto en animales como en seres humanos infectados con este parásito. Los Acs anti-*T. cruzi* aparecen en la circulación pocos días después de la primoinfección y persisten allí durante toda la vida del organismo infectado, aun en individuos carentes de síntomas y/o signos de enfermedad. Las reacciones de inmunidad celular (IMC), en cambio, son menos regulares: tanto in vivo como in vitro sólo parte de los individuos infectados presentan reacciones típicas de IMC.

En la estimulación del sistema inmune están involucrados múltiples Ags parasitarios; el huésped infectado no sólo debe enfrentar a tripomastigotes metacíclicos en la infección original y a tripomastigotes circulantes y amastigotes tisulares derivados de la proliferación parasitaria, sino también a distintos fragmentos subcelulares producidos por la metabolización y/o destrucción de los parásitos por la propia actividad del sistema inmune.

Este amplio espectro antigénico, la demostrada presencia de antígenos comunes a distintos estadíos del parásito y el hecho de que los Ags de epimastigotes de cultivo axénico sean útiles en ensayos de serología diagnóstica justifican el empleo de preparaciones antigénicas de epimastigotes para evaluar fenómenos de IMC en la infección chagásica. La conveniencia de utilizar fracciones subcelulares del parásito en la evaluación de células inmunocompetentes se apoya en la separación del universo antigénico y la consiguiente posibilidad de hacer distincio-



nes en él, según su efecto estimulador. De hecho, estas mismas preparaciones demostraron en trabajos previos, en modelos experimentales, que distintos Ags del *T.cruzi* podrían estar relacionados con mecanismos de protección (337) o de daño tisular (338).

El propósito de los siguientes trabajos fue evaluar la respuesta linfoproliferativa a distintas fracciones físicas del *T.cruzi* y la presencia de reactividad inmune anti-tejidos del huésped; se buscó también relacionar estas respuestas con la presencia de manifestaciones patológicas de la enfermedad y con el tratamiento anti-parasitario.



## MATERIALES Y METODOS

### 3.1. Antígenos

#### 3.1.1. Antígenos de *Trypanosoma cruzi*

##### 3.1.1.1. Fraccionamiento subcelular

La técnica de fraccionamiento subcelular empleada puede verse esquematizada en la Figura 2. Brevemente, se rompen los parásitos por presión-descompresión (353) y se separan distintas fracciones por centrifugación diferencial (68,69).

##### 3.1.1.2. Homogeneización

El HT y las fracciones F y Mc fueron sometidos al siguiente tratamiento adicional de homogeneización; en su transcurso y, salvo expresa indicación en contrario, se trabajó en baño de hielo y se utilizó la solución buffer BKS ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  20mM, EDTA 1mM).

- a- pasaje por homogeneizador de vidrio con mano de teflon Dounce Potter (10 viajes)
- b- centrifugación 15 min a 1000 x g ( $4^\circ\text{C}$ )
- c- separación de sobrenadantes
- d- resuspensión de precipitados con BKS
- e- tratamiento con ultrasonido, 150 seg a 65 W (se utilizó un "standard microtip" y un aparato SUD provisto por Branson Sonic Power, Connecticut, E.E.U.U.)
- f- ídem a (5 viajes), b y c
- g- ídem d con KCL 0.05M, f, b y c
- h- ídem d con KCL 0.10M, f, b y c
- i- ídem d con KCL 0.20M, f, b y c
- j- ídem d con KCL 0.40M, f, b y c
- q- se reúnen sobrenadantes obtenidos en c, f, g, h, i y j



- T- centrifugación 20 min a 5000 x g (4°C) (rotor HB-4, centrífuga Sorvall RC-5B)
- s- se recupera el sobrenadante que es dializado sucesivamente contra H<sub>2</sub>O y BKS hasta prueba de cloruros negativa
- t- el material dializado es filtrado por membranas (Millipore, tipo GSWP, poro 0.22  $\mu$ m), fraccionado y conservado a -20°C
- u- sobre una alícuota se determina el contenido proteico siguiendo la técnica de Lowry et al (334).

#### 3.1.1.3. Caracterización

Las distintas preparaciones antigénicas de *T. cruzi*, obtenidas antes o después de la homogeneización por ultrasonido, fueron comparadas empleando dos técnicas distintas: inmunodifusión y electroforesis.

Inmunodifusión en placa: se dejó difundir a las distintas preparaciones en portaobjetos cubiertos con agar al 1.5% en solución salina empleando como fuente de Acs un suero de conejo anti-homogenato total de *T. cruzi* (68). La difusión fue realizada en cámara húmeda durante 48 hs, las primeras 24 hs a temperatura ambiente y las últimas a 4°C. Luego, la placa fue lavada con solución salina y teñida para revelar proteínas con negro de Amido (335).

Electroforesis: se realizó una electroforesis en bloque en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil-sulfato de sodio al 0.1%. Se empleó un aparato para placa vertical BRL (Bethesda Research Laboratories, Bethesda, Maryland, E.E.U.U.) y gel con acrilamida 10% P/V (339). La electroforesis fue corrida durante 17 hs a 4°C con una intensidad de corriente de 7mA, y el gel teñido para revelar proteínas con azul de Comassie.



### 3.1.2. Antígenos tisulares

#### 3.1.2.1. Obtención

Se obtuvieron muestras de tejido cardíaco, renal y hepático humano durante las autopsias de sujetos fallecidos por causas accidentales. Los donantes estaban clínicamente libres de todo tipo de tumor, enfermedades infecciosas o autoinmunes y trastornos cardiovasculares. Para corroborar la ausencia de lesiones orgánicas relevantes se realizó especialmente un estudio histopatológico de las muestras de los distintos tejidos seleccionados.

Desde la evisceración hasta el tratamiento en el laboratorio las muestras de tejidos fueron conservadas en baño de hielo.

#### 3.1.2.2. Preparación

Los distintos tejidos fueron trozados bajo flujo laminar, empleando tijeras de cirugía y bisturí, sobre filtros de malla de alambre (poro = 50  $\mu$ m). Se filtró las fracciones obtenidas por arrastre con MEM suplementado con antibiótico (Gentamicina 80 mg/l). La suspensión que resultó del trozado exhaustivo y de abundantes lavados fue centrifugada suavemente (15 min a 100 x g, 4°C) para separar los componentes groseros.

El sobrenadante así obtenido fue sometido a un tratamiento homogeneizador en un todo equivalente al anteriormente descrito (ver 3.1.1.2).

### Pacientes

Fueron estudiados 132 voluntarios elegidos entre las personas que concurren al Instituto Fatala Chabén en busca de diagnóstico serológico para la enfermedad de Cha-



gas. Noventa de estos pacientes concurren posteriormente al Servicio de Cardiología del Hospital Ramos Mejía de la ciudad de Buenos Aires, donde se les efectuaron estudios clínico-cardiológicos de rutina. Estos estudios incluyen, en todos los casos, un examen clínico, electrocardiograma (ECG) y radiografía de tórax (Rx).

El diagnóstico cardiológico se realizó con los ensayos de fijación de complemento (340), hemoaglutinación indirecta (341) e inmunofluorescencia indirecta (336); se consideró positivo a todo suero reactivo por dos técnicas, por lo menos. Aquellos pacientes con reacciones negativas para todas las técnicas constituyeron el grupo control.

Tomando en cuenta los datos serológicos y clínicos, los pacientes fueron clasificados en los siguientes grupos:

Grupos control (C): pacientes con serología negativa

(n = 36)

C-0, n=10, datos clínicos incompletos

C-1, n=22, clínicamente normales

C-2, n=4, cardiópatas.

Enfermos chagásicos (ECh): pacientes con serología positiva (n = 96)

ECh-0, n=31, datos clínicos incompletos

ECh-1, n=34, clínicamente normales

ECh-2, n=11, anormalidades cardiológicas mínimas

ECh-3, n=20, cardiópatas.

La Tabla 5 detalla las características de cada grupo, con las siguientes consideraciones:

- a) el grupo C-2 incluye 4 pacientes con diagnóstico de miocardiopatía hipertrófica;
- b) se reconoció como cardiomegalia (cM) a toda silueta cardíaca agrandada, según la evaluación del índice cardiotorácico;



c) se registraron las siguientes alteraciones del ECG:

AVM arritmias ventriculares malignas  
 BAV1 bloqueo aurículo-ventricular de primer grado  
 BAV3 bloqueo aurículo-ventricular de tercer grado  
 BCRD bloqueo completo de rama derecha  
 BIRD bloqueo incompleto de rama derecha  
 BS bradicardia sinusal  
 EV extrasistolias ventriculares, por lo menos bifocales  
 HBAI hemibloqueo anterior izquierdo  
 HBP hemibloqueo posterior  
 HVI hipertrofia del ventrículo izquierdo  
 NSE nódulo sinusal enfermo;

d) el grupo ECh-2 incluye los siguientes casos:

BIRD + cM n=1  
 BIRD n=4  
 BS n=4  
 BAV1 n=1  
 EV n=1

e) el grupo ECh-3 incluye los siguientes casos:

AVM + cM n=1  
 BIRD + BAV1 + EV + cM n=1  
 BAV3 + cM n=1  
 BCRD + NSE + cM n=2  
 BIRD + HVI + cM n=3  
 BCRD + cM n=3  
 BCRD n=3  
 BIRD + HBP n=1  
 BIRD + HBAI n=1  
 BIRD + NSE n=1  
 HBAI n=3

Además, 14 de estos pacientes habían sido tratados con



drogas tripanomicidas, 5 con Nifurtimox (Lampit, Bayer), y 9 con Benznidazol (Radanil, Roche), entre 20 meses y 45 días antes del momento del examen.

#### Aislamiento de células

Las células mononucleares periféricas fueron aisladas empleando la técnica descrita en el capítulo anterior.

Brevemente: la sangre obtenida por punción venosa y recogida sobre anticoagulante fue diluida 1:1 en PBS, depositada sobre columnas bifásicas de FH (con densidades de 1.077 g/ml en la capa inferior y 1.060 g/ml en la superior) y centrifugada 40 min a 400 x g. La interfase superior, que retiene a las formas sanguíneas de *T. cruzi*, fue descartada; y la inferior recuperada. Las células detenidas en esa posición fueron lavadas 3 veces, empleando MEM, y resuspendidas en RPMI suplementado. Con la ayuda de azul de tripán se determinó, en todos los casos, la cantidad y viabilidad de las células aisladas.

En ningún caso se continuó trabajando con poblaciones con viabilidades inferiores al 95% y/o con menos del 95% de células mononucleares.

En la mayoría de los casos se realizó simultáneamente un extendido, para evaluar la fórmula leucocitaria, y un recuento de leucocitos de la sangre original. El recuento se realizó con la ayuda de ácido acético 2%, y los extendidos fueron teñidos con la técnica tradicional de May Grunwald-Giemsa.

Cuando fue necesario (ver Resultados), la muestra original fue repartida para separar las células paralelamente con la columna bifásica y la clásica columna monofásica de FH (333).

#### Cultivo de linfocitos



Las células mononucleares periféricas fueron cultivadas tal como se describiera en el Capítulo 2, excepto las siguientes modificaciones técnicas menores:

- a) se reemplazaron los tubos plásticos con placas de 96 orificios (12 x 8) con fondo plano (Linbro IS-FB 96, Linbro Inc., Hamden, Connecticut, E.E.U.U.);
- b) se utilizó [ $^3\text{H}$ ]-timidina con actividad específica = 6.7 Ci/mmol en lugar de 20 Ci/mmol;
- c) se cambió el cosechador automático MASH por un cosechador automático mini-MASH 23-500 (Microbiological Associates, Walkersville, Maryland, E.E.U.U.);
- d) se utilizaron otros contadores de centelleo líquido en reemplazo del Unilux-IIA; primero un aparato Beckman 650 (Beckman Inst.Inc., Palo Alto, California, E.E.U.U.) y, últimamente, un Rack Beta LSC 1215-004 (LKB-Wallac, Turku, Finland).

Resumen de las condiciones de cultivo:  $2 \times 10^5$  células en 200  $\mu\text{l}$  de volumen; 20% final de suero humano AB, Rh positivo, de complementado; y las cantidades correspondientes de los distintos antígenos según los resultados obtenidos en los estudios de dosis-respuesta-tiempo. Medio empleado: RPMI-1640.

#### Xenodiagnóstico

La búsqueda de formas circulantes del parásito por xenodiagnóstico fue realizada en 42 pacientes, de los cuales resultaron 12 controles y 30 sujetos con serología positiva para la enfermedad de Chagas. La técnica empleada fue descrita en el capítulo anterior y se corresponde con la presentada con total detalle en la publicación correspondiente (329).



## RESULTADOS Y DISCUSION

### 3.1. Caracterización de fracciones subcelulares de *T. cruzi*

Las figuras 3 y 4 presentan los resultados obtenidos por inmunodifusión en placa y por electroforesis en gel al comparar las distintas fracciones subcelulares de *T. cruzi* tratadas con Tritón X-100 al 1% (v/v) entre sí, y con respecto al tratamiento de homogeneización por ultrasonido.

Ambos análisis coinciden en demostrar que las distintas fracciones tienen contenidos proteicos típicos, con bandas comunes y bandas propias de cada preparación, coincidentemente con los resultados obtenidos en estudios anteriores (68,69). Es, asimismo, evidente que el tratamiento con ultrasonido produce un cambio, por lo menos cuantitativo, en la distribución de bandas.

### 3.2. Estimulación policlonal

La Tabla 6 presenta los resultados obtenidos cuando se cultivó a las células en presencia de fitohemoaglutinina (PHA). Como puede verse, los ECh dieron respuestas equivalentes a los controles, tanto se comparen las cantidades de [ $^3\text{H}$ ]-timidina incorporada como los índices de estimulación calculados.

Estos resultados coinciden con los obtenidos antes por otros investigadores (192,199) y nos permiten caracterizar a la muestra poblacional estudiada como normal desde el punto de vista de la capacidad de sus células inmuno-competentes para proliferar in vitro ante un estímulo mitogénico.



### 3.3. Respuesta específica al *T. cruzi*

#### a. Relación dosis de Ag-tiempo de respuesta

Para buscar las mejores condiciones de trabajo se estudió la cinética de la respuesta proliferativa empleando distintas concentraciones de cada una de las preparaciones antigénicas ensayadas. Se realizaron cultivos de 4 a 10 días de duración con concentraciones de hasta 100  $\mu\text{g}$  de proteína por ml de cultivo, en 9 ECh y 5 controles.

En ninguna de las dos variables se obtuvieron resultados rotundos; un ejemplo de los valores obtenidos puede verse en la Tabla 7.

Con respecto al tiempo, las respuestas resultaron relativamente homogéneas; estimulaciones positivas aisladas en el día 4 (3 de 9 con F y 1 de 9 con HT), y abundantes en los días 5, 6 y 7; los valores mayores se obtuvieron, en general, con 6 días de cultivo y este período fue, entonces, fijado para el resto del trabajo.

Con respecto a la dosis antigénica, los resultados fueron más heterogéneos: para ninguna de las preparaciones antigénicas se pudo definir una única concentración que brindara máxima estimulación. Esta característica se ilustra en la Figura 5: se muestran allí los resultados de tres ECh enfrentados a distintas dosis de Mc. Como puede verse, el paciente 1 sólo presenta respuestas positivas frente a dos de las diez concentraciones ensayadas (7,5 y 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) con reacciones francamente negativas tanto por debajo como por encima de tales concentraciones, y en el rango intermedio. El perfil de respuesta del paciente 2 es semejante: tres respuestas positivas de diez ensayadas, y en puntos aislados del rango estudiado: 2,5, 20 y 75  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . El paciente 3, en cambio, da una imagen



más homogénea: responde en el rango 5 a 20  $\mu\text{g/ml}$  y se conserva cerca del límite definido arbitrariamente como de positividad, en casi todo el resto del rango estudiado. Los estudios realizados con las restantes fracciones dieron perfiles igualmente irregulares.

Con estos datos y, ante la imposibilidad práctica de ensayar en todos los pacientes muchas dosis distintas de cada una de las fracciones, se decidió ensayar, según la disponibilidad de células, dos concentraciones distintas de cada preparación a los efectos de mejorar la probabilidad de detectar respuestas. Las dosis elegidas fueron: para HT, F y CS: 25 y 15  $\mu\text{g/ml}$ , y para Mc: 12 y 6  $\mu\text{g/ml}$ .

b. Prevalencia

Con las condiciones así determinadas se estudiaron 96 ECh y 36 controles no infectados. Los resultados obtenidos pueden verse en la Figura 6. De ellos consideramos necesario destacar los siguientes hechos:

- 1- Todas las preparaciones de *T. cruzi* ensayadas estimularon a una proporción significativa de ECh: HT = 54%, F = 48%, Mc = 58% y CS = 46%.
- 2- En particular, Mc resultó la fracción más estimulante (tanto se considere la prevalencia de respuestas positivas como su magnitud media) y más específica: nótese que no estimuló respuestas positivas en ningún control.
- 3- CS evidenció una capacidad inmunogénica que trabajos anteriores, realizados con la técnica de inhibición de la migración leucocitaria, no habían podido demostrar (176).
- 4- F, que ha demostrado contener una importante capacidad



inmunoprotectora en un modelo experimental (343), presentó una capacidad mitogénica relativamente baja.

5- Si bien dijimos que Mc era la fracción más específica, ello no obsta para que todas las preparaciones ensayadas discriminen significativamente entre ECh y controles. La determinación estadística de los límites de confianza (342) indica el siguiente ordenamiento: Mc, HT, F y CS.

6- Si se define como respondedor a todo individuo que da respuesta positiva a, por lo menos, 1 preparación de *T. cruzi*, encontramos que el 79% (72/92) de los ECh y el 17% (6/35) de los controles fueron reactivos.

c. Antígenos: homogenato total y fracciones subcelulares

Es importante destacar que el HT no fue la preparación más mitogénica de todas las estudiadas. La Tabla 8 presenta los resultados agrupando a los pacientes de acuerdo con las preparaciones a las dieron respuesta positiva: se observa que el 67% (48/72) de los ECh respondedores mostró reactividad frente al HT, mientras que el 33% (24/72) no reaccionó a este preparado y sí lo hizo a, por lo menos, 1 de las fracciones subcelulares de *T. cruzi*.

Esto indica claramente que el uso paralelo de múltiples fracciones del parásito aumenta la sensibilidad de la técnica utilizada con respecto al empleo simultáneo del conjunto de fracciones representado por el HT, aun cuando da lugar a la aparición de algunas reacciones positivas entre los controles no infectados. Con todo, la diferencia entre ambos grupos es altamente significativa ( $p < 0,001$ ) y, aunque no se puede descartar la presencia de factores inhibidores en el HT, los resultados obteni-



dos indican la utilidad de fraccionar el universo antigénico original.

d. Linfocitos totales (LT) y linfocitos de alta densidad (LD)

En el Capítulo 2 presentamos resultados que demostraban que los linfocitos aislados de un gradiente bifásico de densidad LD eran tan hábiles como los linfocitos habitualmente recuperables empleando una columna monofásica de Ficoll-Hypaque, LT, para responder con proliferación por lo menos a una estimulación policlonal masiva.

Cuando evaluamos la respuesta al *T. cruzi*, también ensayamos paralelamente células obtenidas por ambos métodos frente a los distintos antígenos parasitarios. Encontramos que en esta respuesta, mucho más selectiva que aquella, el empleo de LD permitía poner en evidencia respuestas más altas y específicas aun que la de los LT. La Tabla 9 ilustra este aspecto mostrando los resultados de 36 ECh y 9 controles estudiados en estas condiciones.

La diferencia de sensibilidad es estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ , test de Wilcoxon).

Un ejemplo límite de las diferencias encontradas se muestra en la Figura 7. Allí puede verse no sólo importantes variaciones en todos los cultivos estimulados sino también en los cultivos de control, no estimulados. Aunque no tenemos una explicación definitiva para este hecho, no podemos descartar el que en la población linfoide de baja densidad queden retenidos linfocitos con capacidad supresora u otras células responsables de una estimulación linfocitaria autóloga, que fuera descripta en algunos ECh (344).



e. Efecto del tratamiento con drogas tripanocidas

Entre los aspectos clínicos considerados al evaluar los ECh estudiados se prestó especial atención al tratamiento específico que hubieren recibido o estuvieren recibiendo, dado que no sólo no existen aún criterios absolutos y uniformes sobre los requisitos clínicos que debe satisfacer un paciente para ser tratado, sino que no se conoce prácticamente ningún antecedente sobre la influencia del tratamiento tripanomicida sobre los mecanismos de IMC.

La Tabla 10 muestra los resultados obtenidos: se ve allí que el conjunto de ECh respondedores al *T. cruzi* es equivalente en ambos grupos: 75% de los 61 ECh, vírgenes de tratamiento, y 86% de los 14 pacientes tratados con cualquiera de las drogas tripanomicidas de uso habitual. No pudimos encontrar diferencias al comparar los pacientes tratados con cada una de las drogas.

Dos tendencias merecen ser comentadas: los enfermos tratados presentan mayor proporción de positividad que los no tratados, ante una fracción presuntamente relacionada con mecanismos de daño tisular (Mc) y menor proporción ante aquella fracción (F) vinculada con mecanismos inmuno-protectores. Esto sugiere que el tratamiento, si bien es eficaz para disminuir el número de parásitos alojados en un paciente (345), no tendría efecto sobre el desarrollo de los mecanismos patogénicos de la enfermedad. Esta posibilidad es compatible con hallazgos anteriores en enfermos crónicos tratados con tripanomicidas: ya se ha documentado la persistencia de la parasitemia en pacientes del centro y norte de Brasil (346), y la ausencia de diferencias serológicas (347).

Las drogas tripanomicidas no alteran el recuento y la



fórmula leucocitaria, ni las cantidades circulantes de distintas poblaciones de células mononucleares (linfocitos T y B, y monocitos) (199), pero sí mostraron afectar algunas respuestas funcionales: hicieron perder la respuesta de inhibición de la migración leucocitaria (194, 199). En uno de estos trabajos (194) el Ag empleado fue la fracción flagelar del parásito preparada en forma semejante a la que nosotros utilizamos y, coincidentemente con nuestros resultados, los ECh tratados resultaron en ese caso menos reactivos que los no tratados.

Todos estos datos sugieren que el tratamiento podría afectar selectivamente a los distintos equilibrios antígeno-respuesta que juegan en la infección chagásica, e indican claramente que existen importantes diferencias individuales.

#### f. Respuesta "in vitro" y xenodiagnóstico

La presencia de formas circulantes de *T. cruzi* pudo ser demostrada en el 23% (7/30) de los ECh estudiados con xenodiagnóstico (XD). Cuando se analizó la relación entre estos resultados y la reactividad linfoproliferativa in vitro al parásito, se encontró que el 100% de los ECh con XD positivo y el 74% (17/23) de los pacientes con XD negativo eran respondedores, diferencia que no es estadísticamente significativa ( $p < 0,10$ ). Esta tendencia a mayor positividad se encontró con todas las fracciones ensayadas, haciéndose máxima con Mc (86% = 6/7 vs. 44% = 8/18). Aunque esta amplia diferencia porcentual tampoco es estadísticamente significativa ( $p < 0,10$ ) y, por ende, no alcanza para definir la importancia que tendría la masa antigénica circulante en relación con la estimulación linfoproliferativa señala, sin embargo, una tendencia que será necesario



confirmar con el estudio de mayor número de pacientes.

g. Perfil de respuesta a los antígenos de *T. cruzi*

El análisis del perfil de reactividad de los ECh respondedores, que se resume en la Tabla 11, muestra que el 29% de los pacientes ensayados con todas las preparaciones de *T. cruzi* dio respuesta positiva en todos los casos; el 71% restante sólo respondió a algunas preparaciones.

Tal vez este variable perfil es, simplemente, una consecuencia de la imposibilidad de realizar los estudios con dosis óptimas de cada Ag para cada paciente, como se discutió antes, pero más importante quizás es que esa variabilidad revela otra variabilidad: la del nivel en que se encuentra regulada la respuesta inmune a cada epitope, resultado de la acción e interacción de numerosas/<sup>variables</sup> que, en la infección natural, no sólo son desconocidas sino también impredecibles. Factores como la dosis infectante, la antigüedad de la infección y el perfil antigénico del parásito juegan su papel junto a la constitución genética del huésped y su relación con la interacción con el parásito y los factores ambientales, nutricionales, etc. que, como vimos en el Capítulo 1, tienen efecto demostrado sobre la respuesta inmune y la evolución de la enfermedad.

Por estar estrechamente vinculado con este aspecto, debemos recordar que ningún investigador pudo poner en evidencia fenómenos de IMC en el 100% de los ECh que estudió (194,200,204,205).

3.4. Reactividad a tejidos homólogos

En el Capítulo 1 hemos presentado información clínica y experimental que sugiere la existencia de alguna relación entre la actividad del sistema inmune en la infección cha-



gásica y los mecanismos de lesión tisular que la caracterizan. Sin embargo, hasta el presente no se ha logrado poner en evidencia la causa desencadenante ni el o los mecanismos específicamente involucrados.

En otras enfermedades causadas por microorganismos intracelulares, Lepra (349) y Leishmaniasis (357), ha sido posible relacionar el pronóstico con la actividad inmune celular específica; y en la infección chagásica experimental se ha logrado inducir daño tisular en ausencia de infección por el simple inóculo de alguna fracción del parásito(338).

Con estos antecedentes nos propusimos investigar la respuesta linfoproliferativa de los ECh a tejidos homólogos, especialmente a miocardio.

Los resultados obtenidos pueden verse en la Tabla 12: el 40% de los ECh estudiados y ningún control sano dieron respuesta positiva frente a un homogeneizado de miocardio humano normal. En ensayos paralelos frente a Ags del *T. cruzi* los mismos pacientes mostraron reactividades igualmente específicas; más aun, todos los ECh reactivos frente a miocardio fueron también reactivos al *T. cruzi*.

La especificidad de esta reactividad anti-miocardio fue estudiada desde dos ángulos distintos: los pacientes y el tejido. Para el primero se investigó la presencia de respuestas equivalentes en pacientes con miocardiopatías de etiología no chagásica, y se encontró que 1 de 4 sujetos con cardiopatía hipertrófica resultaba reactivo en las mismas condiciones.

Para evaluar la especificidad tisular de esta reactividad se emplearon paralelamente muestras de hígado y riñón homólogo; los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 13: como puede verse, todos los tejidos preparados y ensayados en iguales condiciones fueron capaces de inducir



respuestas blastomitogénicas in vitro.

Diez de los 16 ECh estudiados reaccionaron al *T. cruzi*; de esos 10, 9, 6 y 5 reaccionaron ante miocardio, hígado y riñón, respectivamente, mientras que ninguno de los 6 ECh que no reaccionaron al parásito lo hicieron ante cualquiera de los tejidos. Esta importante asociación de reactividades mostró importante correlación estadística cuando se compararon las intensidades de las distintas respuestas (ver Tabla 13).

En resumen: encontramos una significativa reactividad inmune anti-tejidos humanos en los ECh; esta actividad no parece dirigida selectivamente hacia estructuras específicas de algún tejido sino, tal vez, hacia elementos comunes a distintos tejidos. Probablemente, los mecanismos responsables de este fenómeno no sean exclusivos de la infección chagásica sino, más bien, comunes a distintos procesos patológicos. Acaso la exclusividad esté en los pasos desencadenantes.

### 3.5. Relación del estado clínico de los enfermos chagásicos con la reactividad a *T. cruzi* y a tejidos homólogos

Los resultados presentados en lo que va de este capítulo demuestran claramente que la mayoría de los ECh son capaces de responder con linfoproliferación a la estimulación por distintos antígenos del *T. cruzi*, y que buena parte de ellos también muestra reactividad inmune ante distintos tejidos humanos. Interesa entonces analizar si estas reactividades tienen alguna relación con el estado clínico y, para ello, hemos agrupado a los pacientes de acuerdo con las categorías presentadas en Materiales y Métodos; sintéticamente: pacientes infectados sin ninguna



evidencia de daño tisular (ECh-1), pacientes con signos y/o síntomas mínimos (ECh-2), y pacientes con miocardiopatía manifiesta (ECh-3).

La Tabla 14 presenta los resultados obtenidos ante las distintas preparaciones de *T. cruzi*. Dos hechos deben ser destacados:

- 1- La presencia de inmunorreactividad anti-*T. cruzi* es homogénea en todos los grupos; y
- 2- la reactividad a las distintas fracciones es, en cambio, heterogénea: los ECh con miocardiopatía manifiesta (ECh-3) presentan más y mayores respuestas a las fracciones F y CS que los ECh-1. Los ECh-2 presentan resultados intermedios, semejantes a los ECh-3 para CS y a los ECh-1 para F, aunque el menor número de pacientes en este grupo y su heterogeneidad clínica hacen más difícil el análisis. que, por lo tanto, limitamos a los dos grupos polares. La reactividad a Mc, que señalamos en la primera parte de este capítulo como la de mayor especificidad para la enfermedad de Chagas, es equivalente en todos los grupos.

Podemos sintetizar estos resultados diciendo que el desarrollo de patología clínicamente evidenciable no parece ir acompañada de alguna ganancia o pérdida de inmunorreactividad ante los antígenos del parásito, pero sí parece ir asociada a una muy diferente modulación de la respuesta al *T. cruzi*. Esto se desprende de la mayor frecuencia de respuestas linfoproliferativas positivas que los pacientes sintomáticos presentan ante F y CS que ante Mc o HT. Es difícil relacionar esta observación con la mejor capacidad inmunoprotectora que F demuestra en modelos experimentales (343) y con la capacidad de inducir daño



hístico que muestra Mc cuando es ensayada como inmunógeno (338).

La Figura 8 presenta los resultados de estos mismos pacientes en relación con la respuesta a corazón. Como puede verse, no hay diferencias ni en la proporción de respuestas positivas ni en la intensidad media de esas respuestas entre los distintos grupos. Estos resultados podrían revelar una reactividad permanente a los antígenos tisulares y apoyaría anteriores sugerencias en el sentido de que si los mecanismos de lesión tisular son de naturaleza inmunológica, podrían estar presentes desde el comienzo de la infección y sólo se harían evidentes después de un período "silencioso" caracterizado por la existencia de lesiones mínimas insuficientes para expresarse como alteraciones evidentes de la fisiología del organismo infectado. Sólo su desarrollo hasta involucrar una masa crítica, aún no definible, de tejido(s) dañado(s) haría manifiestas las lesiones características de la enfermedad de Chagas.



### CONCLUSIONES

En este capítulo hemos presentado datos experimentales que demuestran que los linfocitos periféricos de los enfermos chagásicos crónicos, obtenidos en condiciones tales que aseguran que no están contaminados con formas circulantes de *T. cruzi*, son capaces de responder in vitro a la estimulación con distintos antígenos parasitarios y/o con antígenos tisulares homólogos. Esta capacidad de respuesta no es alterada por el tratamiento con drogas tripanomicidas y se presenta tanto en pacientes con xenodiagnóstico positivo como en aquéllos en quienes no se pudo demostrar la presencia de parásitos circulantes.

Es de gran importancia el hallazgo de diferencias en el perfil de reactividad a los distintos antígenos parasitarios según el progreso de la patología chagásica: si bien desde un enfoque global el reconocimiento y/<sup>1a</sup> respuesta al parásito aparecen homogéneos e independientes del estado clínico, esto es sólo una verdad a medias; los pacientes con cardiopatía chagásica manifiesta presentan una reactividad más intensa y dirigida a mayor cantidad de estructuras del *T. cruzi* que aquellos pacientes libres de síntomas y/o signos patológicos.

En cambio, la reactividad anti-tejidos se presentó con semejante intensidad y positividad en todos los estadios clínicos considerados, y con una significativa inespecificidad de órgano, sugiriendo que se trataría de un mecanismo generalizado de temprana aparición y, por lo tanto, más probablemente vinculado con el desencadenamiento de mecanismos de daño tisular que con su progreso. De todas maneras, estas hipótesis sólo podrán corroborarse con el seguimiento clínico de los pacientes.



Figura 2

METODO DE OBTENCION DE FRACCIONES SUBCELULARES  
DE TRYPANOSOMA CRUZI

88

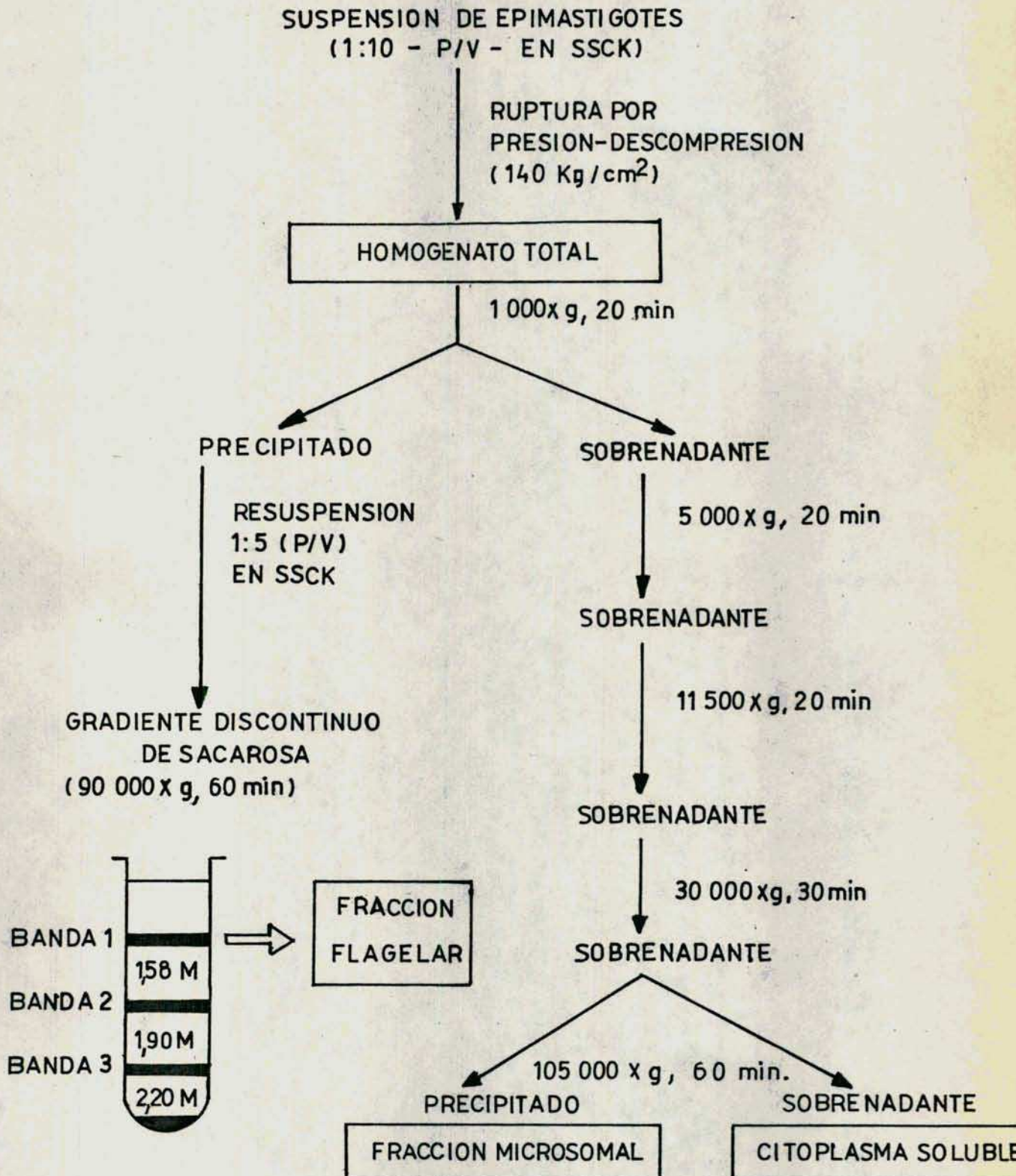




Tabla 5  
POBLACION ESTUDIADA<sup>a</sup>

Grupo	n	Sexo ♂-♀	Edad(años) $\bar{x} \pm SD$ (rango)		
C-0	10	7-3	29 <sup>+</sup> 3(18-50)	sin datos	sin datos
C-1	22	13-9	27 <sup>+</sup> 2(18-43)	normal	normal
C-2	4	2-2	42 <sup>+</sup> 2(37-46)	alterado <sup>a</sup>	cardiomegalia
ECh-0	31	26-5	38 <sup>+</sup> 2(23-66)	sin datos	sin datos
ECh-1	34	20-13	32 <sup>+</sup> 2(18-63)	normal	normal
ECh-2	11	7-4	33 <sup>+</sup> 3(19-45)	alterado <sup>a</sup>	normal (n=10) cardiomeg. (n=1)
ECh-3	20	14-6	37 <sup>+</sup> 2(23-61)	alterado <sup>a</sup>	normal (n=9) cardiomeg. (n=11)

a: ver texto



Figura 3  
INMUNODIFUSION EN PLACA

Antígenos de *T.cruzi*: Homogenato total (HT) y fracciones flagelar (F), microsomal (Mc) y citoplasmática soluble (CS), antes y después de tratamiento con ultrasonido (HTs, Mcs y Fs)

Antisuero: suero de conejo anti-HT de *T.cruzi*

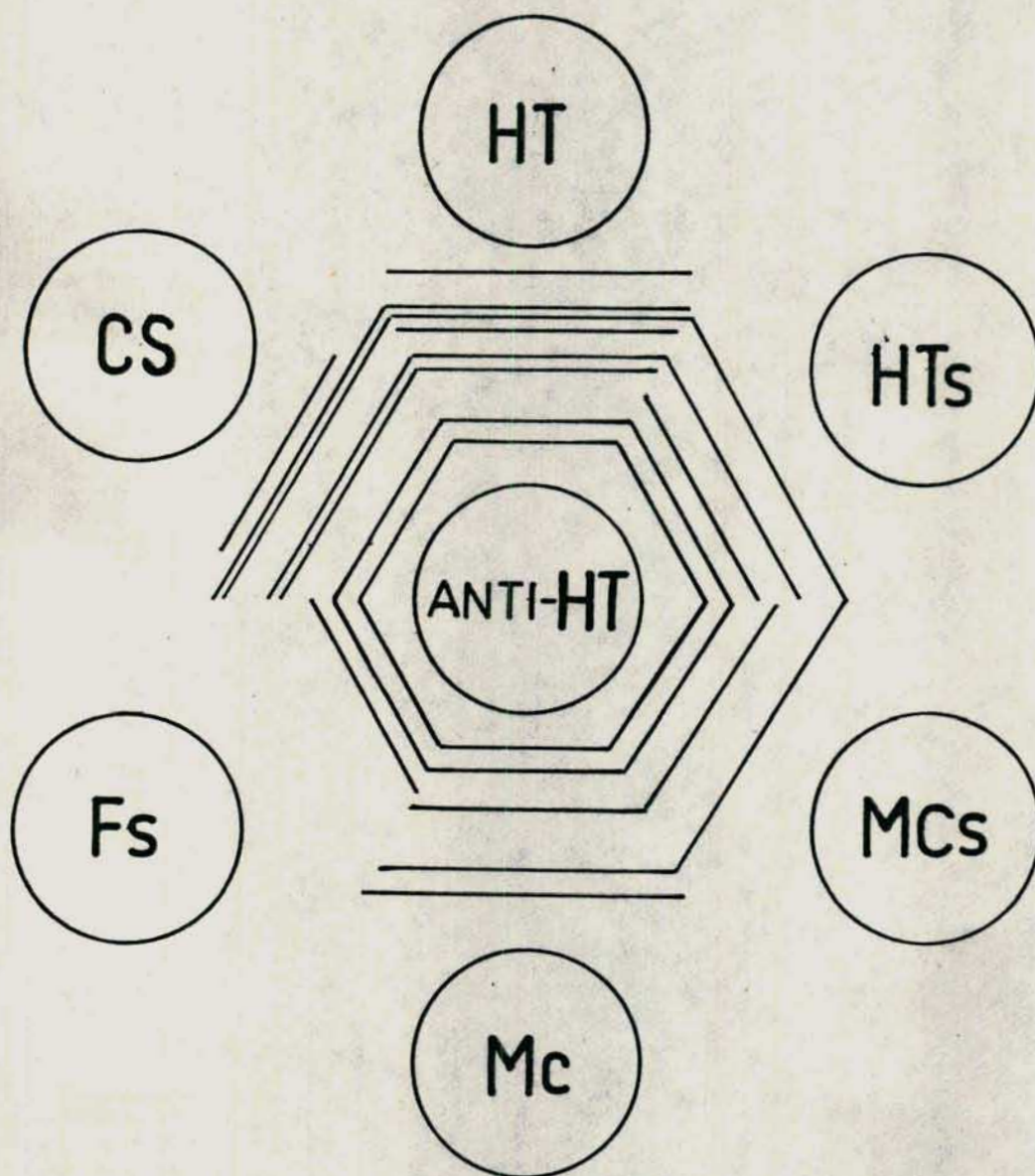
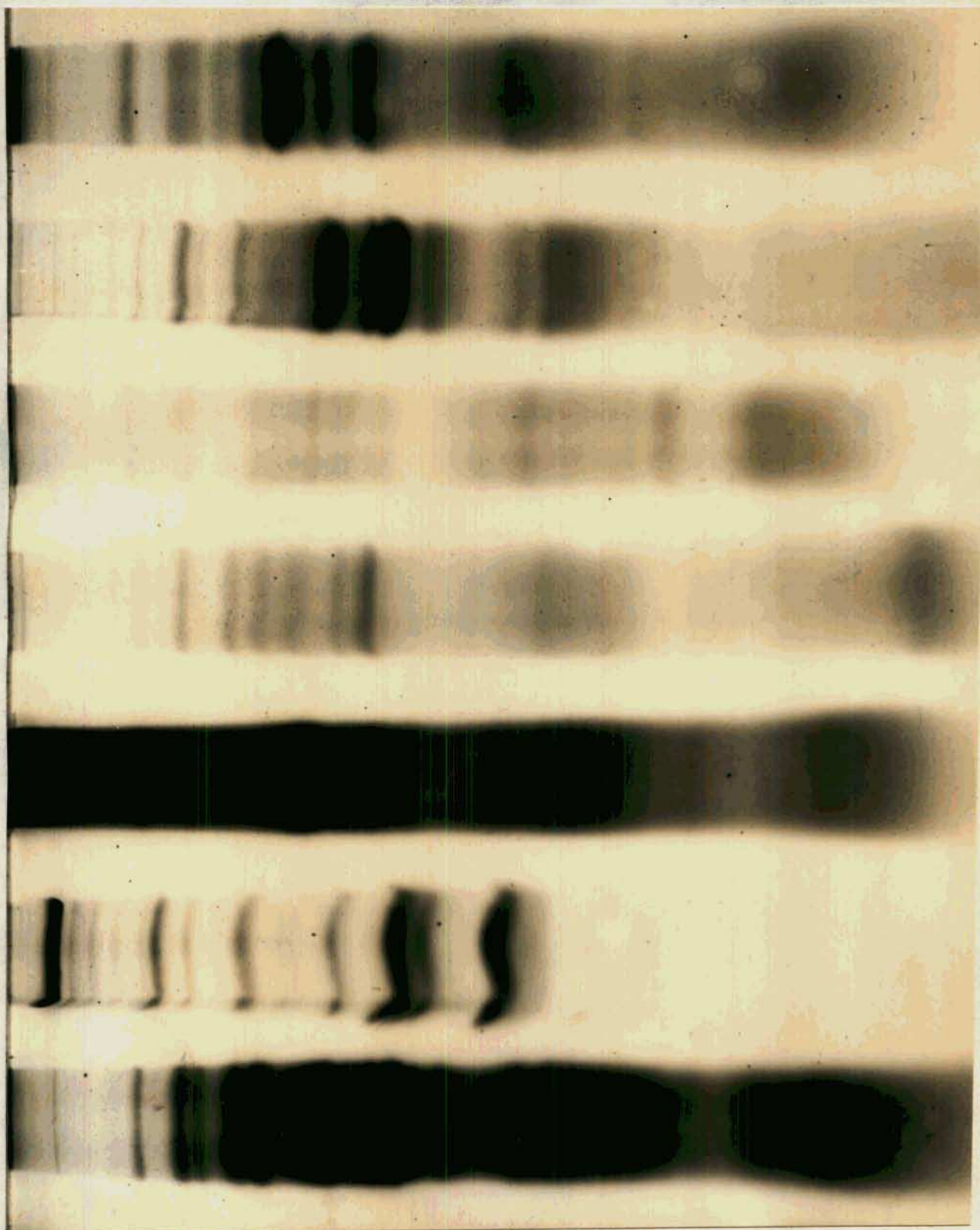




Figura 4  
ELECTROFORESIS EN PLACA DE PREPARACIONES ANTIGENICAS DE  
TRYPANOSOMA CRUZI



sentido de migración →



Tabla 6  
RESPUESTA A LA PHA EN PACIENTES CHAGASICOS

		ECh (n=46)	Controles (n=21)
CONTROL <sup>a</sup>	$\bar{x} \pm SD$	1227 $\pm$ 108	1304 $\pm$ 124
	(rango)	(275 - 3163)	(299 - 2280)
PHA <sup>a</sup>	$\bar{x} \pm SD$	102252 $\pm$ 7410	95181 $\pm$ 12383
	(rango)	(24188 - 263134)	(20155 - 234453)
IE <sup>b</sup>	$\bar{x} \pm SD$	118.8 $\pm$ 13.9	83.5 $\pm$ 12.8
	(rango)	(16.3 - 494.8)	(24.0 - 254.0)

a: datos expresados en cpm de [<sup>3</sup>H]-timidina incorporada.

b: datos expresados como índice de estimulación (IE):  
cpm en presencia de PHA menos cpm inespecíficas/cpm  
en ausencia de PHA menos cpm inespecíficas.



Tabla 7

CINETICA DE LA RESPUESTA PROLIFERATIVA<sup>a</sup> DE LINFOCITOS  
PERIFERICOS DE ENFERMOS CHAGASICOS ANTE FRACCIONES DE  
T. CRUZI

## A. Homogenato total

Dosis μg/ml	Días			
	4	5	6	7
15	-	6.0	10.0	3.2
25	5.4	8.8	12.6	4.1
50	6.0	5.4	11.0	2.9
100	3.4	4.0	2.1	1.0

## B. Fracción flagelar

Dosis μg/ml	Días			
	4	5	6	7
	3.2	1.6	6.6	-
25	14.8	1.1	15.8	0.3
50	15.1	1.3	2.2	0.3
100	8.5	0.7	2.2	0.4

## C. Fracción microsomal

Dosis μg/ml	Días			
	4	5	6	7
6	0.3	0.7	4.5	-
12	1.3	0.9	2.1	0.9
25	1.3	0.8	1.2	1.6
50	1.0	0.9	1.2	1.2

## D. Citoplasma soluble

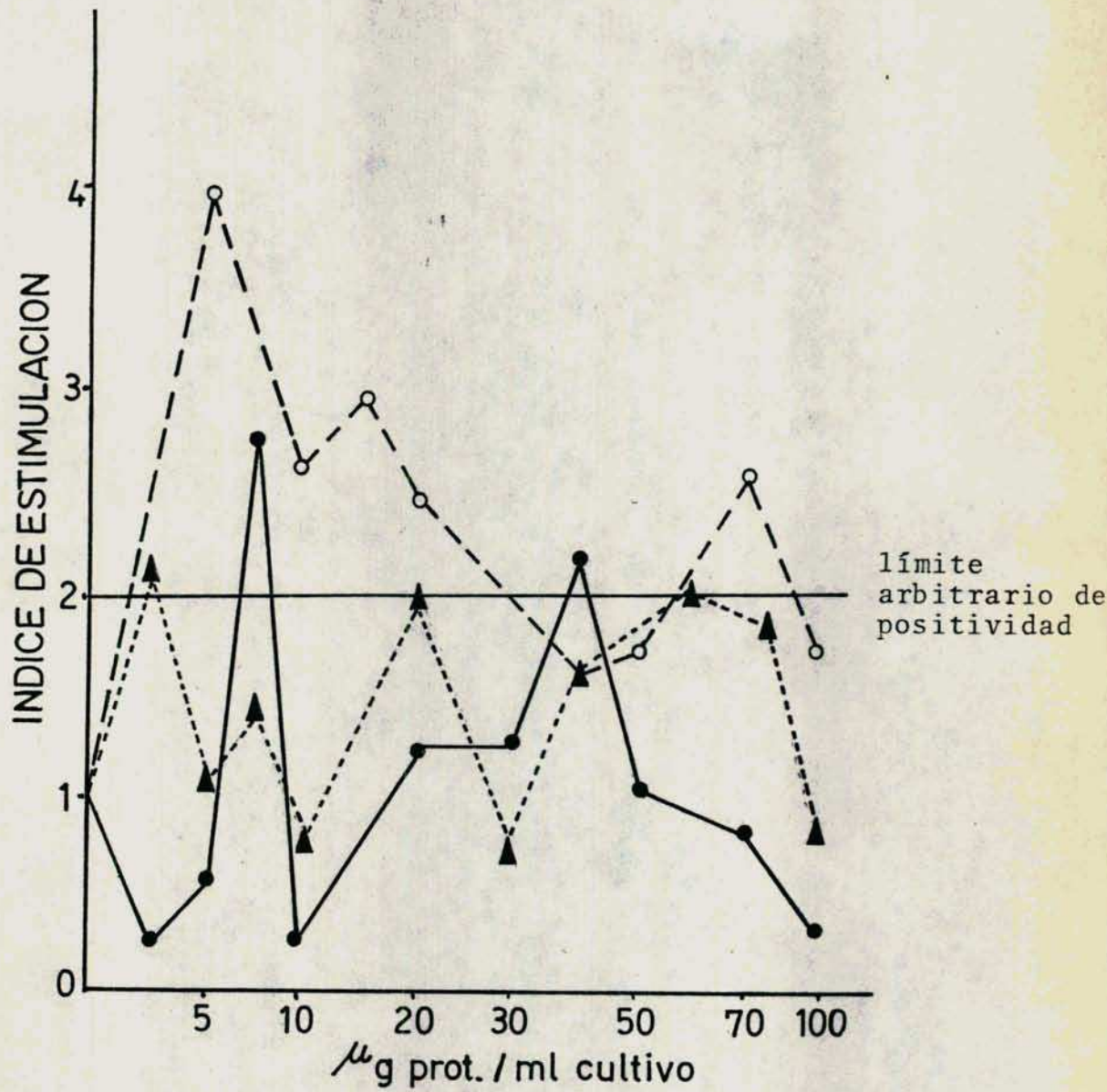
Dosis μg/ml	Días			
	4	5	6	7
15	0.5	2.1	3.5	1.0
25	1.1	4.6	10.3	0.9
50	1.2	1.0	4.1	1.4
100	1.6	4.6	8.0	1.1

a: datos expresados como índices de estimulación.



Figura 5

ESTIMULACION DE LINFOCITOS PERIFERICOS HUMANOS EN CULTIVO  
FRENTA A DISTINTAS DOSIS DE FRACCION MICROSOMAL DE *T. CRUZI*  
(SE PRESENTAN DATOS DE TRES ENFERMOS CHAGASICOS)





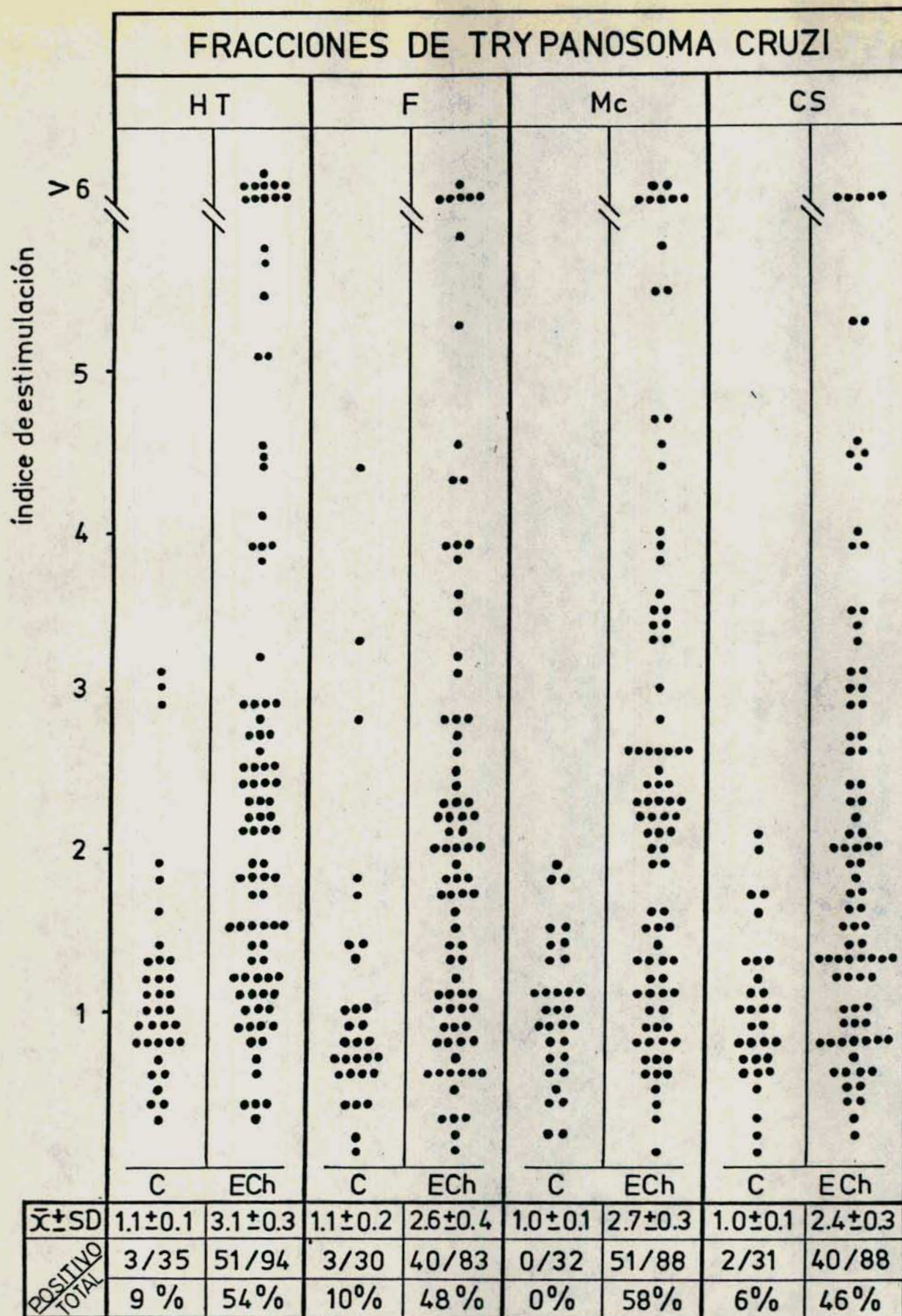


FIGURA 6: EFECTO BLASTOMITOGÉNICO DE DISTINTAS FRACCIONES DE *TRYPANOSOMA CRUZI* SOBRE LINFOCITOS PERIFÉRICOS DE 94 ENFERMOS CHAGÁSICOS Y 35 CONTROLES



Tabla 8

DIFERENTE RESPUESTA LINFOPROLIFERATIVA AL HOMOGENATO  
TOTAL Y A FRACCIONES SUBCELULARES DE *T. CRUZI* EN ENFERMOS  
CHAGASICOS (ECh)

Respuesta a		ECh	Controles
HT <sup>a</sup>	FSubc. <sup>b</sup>	(n=92)	(n=35)
SI	SI <sup>c</sup>	42	1
SI	NO	6	2
NO	SI	24	3
NO	NO	20	29

a: homogenato total de *T. cruzi*

b: fracciones subcelulares de *T. cruzi*: (flagelar, microsomal y citoplasma soluble)

c: se consideró positivo a todo paciente que respondió, por lo menos, a 1 de las fracciones ensayadas



Tabla 9

LINFOCITOS TOTALES Y DE ALTA DENSIDAD: REACTIVIDAD AL  
T.CRUZI

	Linfocitos de alta densidad	Linfocitos totales
ECh	28/36 <sup>a,b</sup> (78%)	12/36 (61%)
Controles	2/9 (22%)	4/9 (44%)

a: datos expresados como: nro.de individuos respondedores  
a, por lo menos, 1 preparación de T.cruzi/nro.de indi-  
viduos estudiados

b: análisis estadístico, ECh-Linfocitos de alta densidad:  
vs.controles ( $\chi^2 = 9.66$ ,  $p < 0,0025$ ), vs.ECh-Linfoci-  
tos totales ( $\chi^2 = 14.46$ ,  $p < 0,001$ )



FIGURA 7

EJEMPLO DE REACTIVIDAD AL *TRYPANOSOMA CRUZI*  
LINFOCITOS TOTALES (□) Y DE ALTA DENSIDAD (■)  
DE UN PACIENTE CON XENODIAGNOSTICO POSITIVO

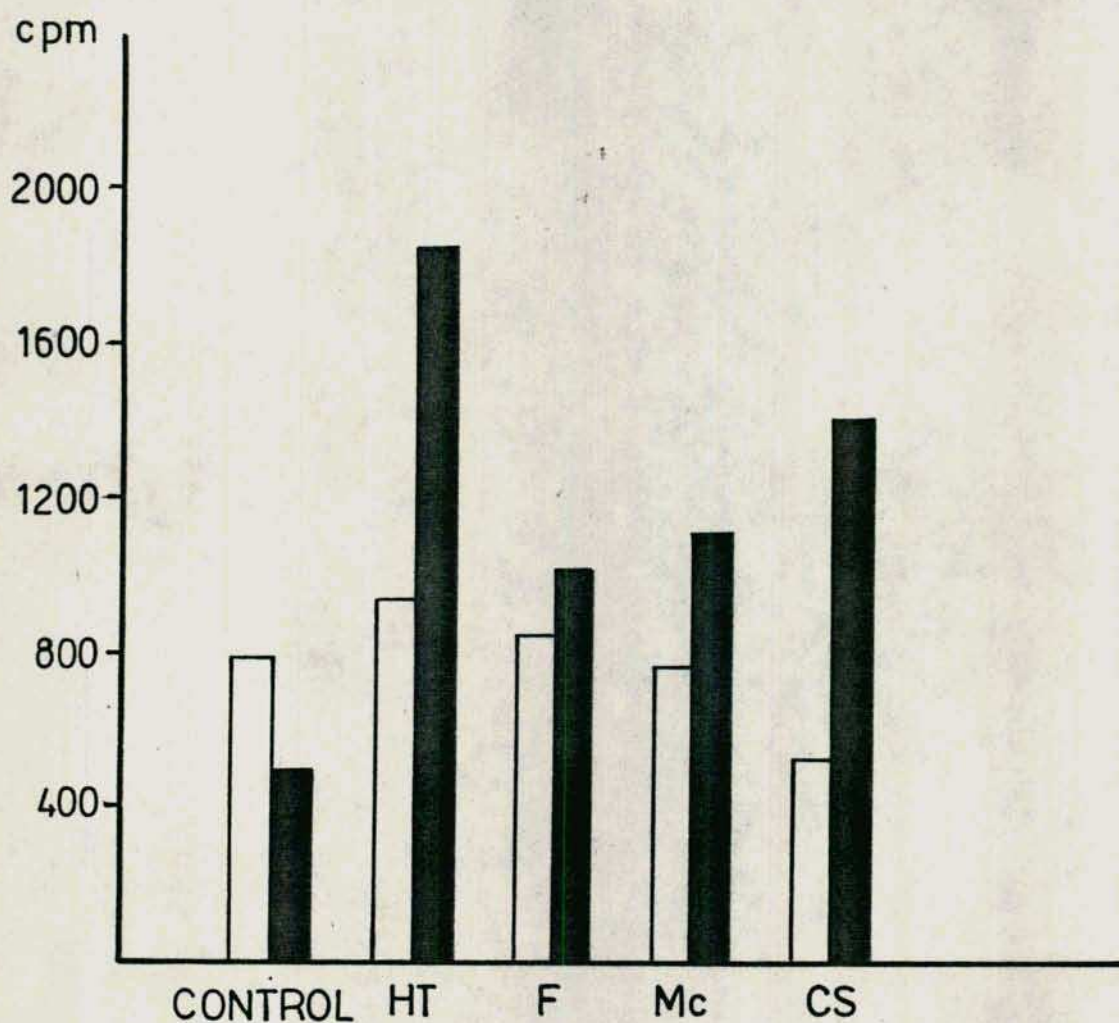




Tabla 10

RESPUESTA LINFOPROLIFERATIVA<sup>a</sup> EN ENFERMOS CHAGASICOS (ECh)  
EN RELACION CON EL TRATAMIENTO CON DROGAS TRIPANOMICIDAS

	HT	F	Mc	CS	<i>T. cruzi</i> <sup>b</sup>
ECh no tratados	29/61 (48%)	26/52 (50%)	33/49 (67%)	25/60 (42%)	46/61 (75%)
ECh tratados	9/14 (64%)	4/12 (30%)	10/14 (71%)	9/14 (64%)	12/14 (86%)

a: se presentan número de respuestas positivas/número total de individuos estudiados

b: se considera RESPONDEDOR a todo individuo que da respuesta positiva (ver Materiales y Métodos) a, por lo menos, 1 de las preparaciones antigénicas ensayadas



Tabla 11

PERFIL DE RESPUESTAS A ANTIGENOS DEL T. CRUZI EN 58 ECh  
RESPONDEDORES<sup>a</sup>

HT	T. CRUZI			N°	ECh
	F	Mc	CS		
+	+	+	+	17	29
+	+	+		7	
+	+		+	0	22
+		+	+	3	
	+	+	+	3	
+	+			0	
+		+		5	
+			+	2	21
	+	+		2	
	+		+	1	
		+	+	2	
+				5	
	+			4	28
		+		3	
			+	4	

a: se considera RESPONDEDOR a todo individuo que da respuesta positiva a, por lo menos, 1 de las preparaciones antigénicas ensayadas



Tabla 12

REACTIVIDAD "IN VITRO" ANTI-MIOCARDIO HOMOLOGO DE  
LINFOCITOS PERIFERICOS DE ENFERMOS CHAGASICOS (ECh)

	Respuesta linfoproliferativa	
	a	
	Miocardio	<i>T. cruzi</i>
ECh	30/74	56/74 (76%)
Controles	0/18	3/18 (17%)

a: Análisis estadístico de proporciones de pacientes  
respondedores:  $\chi^2 = 11.3$ ,  $p < 0,001$



Tabla 13

DISTINTOS TEJIDOS HUMANOS ESTIMULAN "IN VITRO" RESPUESTAS  
PROLIFERATIVAS DE LINFOCITOS DE ENFERMOS CHAGASICOS CRONICOS

ECh	Respuesta a			
	<i>T. cruzi</i> <sup>a</sup>	Corazón <sup>b,c</sup>	Riñón	Hígado
1	sí	14.0	10.5	6.2
2	sí	7.4	6.2	s.d
3	sí	3.7	3.2	3.2
4	sí	3.1	2.6	3.7
5	sí	3.0	4.1	4.6
6	sí	2.8	1.7	2.2
7	sí	2.5	1.5	2.6
8	sí	2.5	0.7	0.4
9	sí	2.3	1.6	1.7
10	sí	1.2	1.5	0.6
11	no	1.8	1.1	1.3
12	no	1.2	0.3	0.4
13	no	0.8	1.7	1.0
14	no	0.8	1.0	0.7
15	no	0.8	s.d	0.9
16	no	0.2	0.1	1.4

a: se considera respondedor (sí) a todo ECh que dio respuesta positiva a, por lo menos, 1 fracción de *T. cruzi*

b: se presentan índices de estimulación (cpm en presencia de antígeno/cpm control)

c: estudios de correlación estadística: Corazón vs. Riñón, Corazón vs. Hígado y Riñón vs. Hígado:  $p < 0,001$

sd: sin datos.



Tabla 14

EFFECTO MITOGENICO DE DISTINTAS FRACCIONES DE *T. CRUZI* EN RELACION CON EL ESTADO CLINICO<sup>a</sup> DE UN GRUPO DE ENFERMOS CHAGASICOS CRONICOS (ECh)

	HT <sup>b</sup>	F <sup>d</sup>	Mc	CS <sup>e</sup>	<i>T. cruzi</i> <sup>c</sup>
ECh-1	14/33 (42%) 2.2 <sup>±</sup> 0.3	11/29 (38%) 2.0 <sup>±</sup> 0.6	17/32 (53%) 2.6 <sup>±</sup> 0.4	9/33 (27%) 1.8 <sup>±</sup> 0.3	23/33 (70%)
ECh-2	7/11 (64%) 4.4 <sup>±</sup> 1.3	2/9 (22%) 2.0 <sup>±</sup> 0.5	6/11 (55%) 2.5 <sup>±</sup> 0.5	9/11 (82%) 3.4 <sup>±</sup> 0.7	9/11 (82%)
ECh-3	8/20 (40%) 2.7 <sup>±</sup> 0.6	11/16 (69%) 2.7 <sup>±</sup> 0.4	11/20 (55%) 3.4 <sup>±</sup> 1.0	12/19 (63%) 3.0 <sup>±</sup> 0.9	15/20 (75%)

a: ver criterio de clasificación en Materiales y Métodos.

b: se presentan resultados como: nro.de pacientes respondedores/pacientes estudiados (%) y  $\bar{x} \pm$  SD de los correspondientes índices de estimulación.

c: se presenta: fracción de pacientes respondedores a, por lo menos, 1 fracción de *T. cruzi*/pacientes estudiados (%).

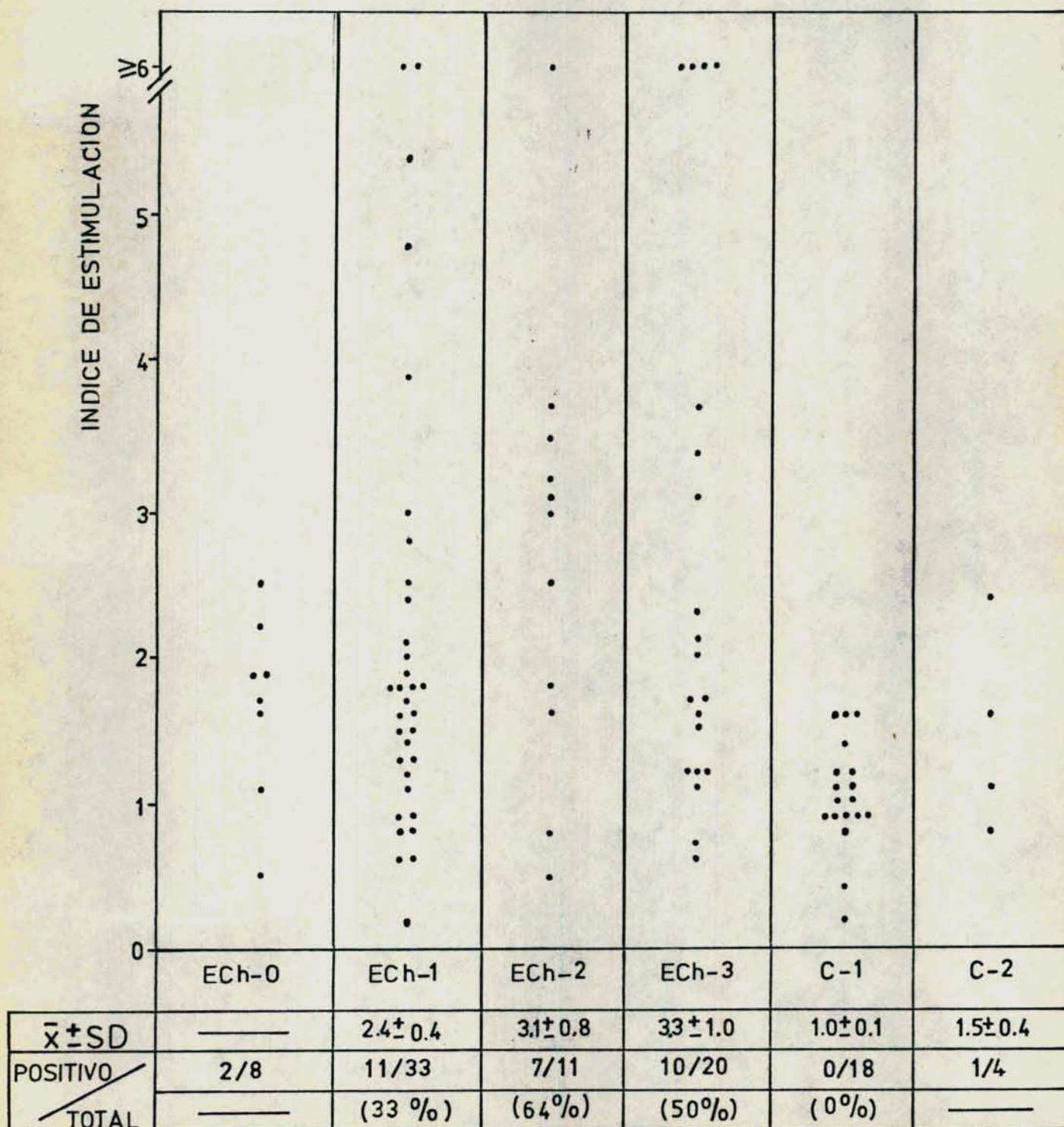
Análisis estadístico de proporción de pacientes respondedores:

d:  $\chi^2 = 6.13$ ,  $p < 0,050$

e:  $\chi^2 = 12.45$ ,  $p < 0,005$



RESPUESTA LINFOPROLIFERATIVA IN VITRO  
DE ENFERMOS CHAGASICOS CRONICOS ANTE  
MIOCARDIO HUMANO NORMAL





#### CAPITULO 4

RELACION ENTRE MECANISMOS INMUNES HUMORALES  
Y CELULARES EN LOS ENFERMOS CHAGASICOS CRONICOS



## INTRODUCCION

Los fenómenos humorales y celulares de respuesta a la infección por el *T.cruzi* son relativamente conocidos, mucho más en el caso de los mediados por Acs pero, aun así, prácticamente nada se sabe de los mecanismos de regulación que los gobiernan y menos aun de los que los vinculan.

En el Capítulo anterior hemos presentado datos experimentales que permitieron conocer algunas características de la respuesta inmune celular en los enfermos chagásicos. En el presente Capítulo, nos proponemos investigar la relación que existe entre estas reactividades y los aspectos humorales mediados por Acs, tanto en lo que se refiere específicamente a la respuesta al *T.cruzi* y a Acs tisulares, como a las posibles vinculaciones que pudiese haber entre ambas. A tales fines, se agregaron a los ensayos de linfoproliferación in vitro una serie de estudios para evaluar distintos aspectos de la actividad humoral, tanto en la reactividad inmune dirigida contra los Acs del *T.cruzi* como en la dirigida contra Acs tisulares homólogos.

Inicialmente, se realizaron cultivos de linfocitos empleando en ensayos paralelos suero humano normal y suero chagásico, tanto autólogo como alogeneico. En estas condiciones, la estimulación por distintos Acs de *T.cruzi* mostró importantes diferencias que llevaron a analizar los sueros empleados.

Se estudió el perfil de especificidades de los Acs séricos de acuerdo con el siguiente detalle: Acs reactivos con Acs de membrana de *T.cruzi* (ensayo de inmunofluorescencia), Acs reactivos con Acs citoplasmáticos (ensayo



de hemoaglutinación) y Acs reactivos con distintas fracciones subcelulares del parásito a través de una reacción inmunoenzimática. A estos estudios, que revelaron distintas actividades mediadas por Acs IgG, se agregó la determinación de Acs IgM específicos (ensayo de captación). Para explorar las propiedades funcionales de los Acs séricos, se estudió su capacidad citotóxica, contra formas de cultivo del parásito, y su capacidad para lisar formas circulantes de *T. cruzi*. Todos estos resultados fueron relacionados con la respuesta linfoproliferativa al parásito. También la actividad celular anti-tejido se mostró sensible a la presencia de suero chagásico, por lo que se estudió la reactividad humoral anti-miocardio homólogo empleando distintos ensayos: inmunoenzimáticos, para Acs de homogeneizado total de este tejido, y por inmunofluorescencia para distintas estructuras celulares del mismo (laminina y miosina), y se relacionan estos resultados con la respuesta celular al tejido.

Finalmente, se investigaron las posibles relaciones entre los distintos fenómenos celulares y humorales con actividad anti-*T. cruzi* y anti-tejido.



## MATERIALES Y METODOS

### Pacientes

Para los distintos estudios presentados en este Capítulo se utilizaron muestras de sangre de un total de 60 pacientes que fueron agrupados de acuerdo con los resultados de la serología y el examen clínico, según los criterios presentados en el Capítulo anterior (ver Tabla 5), en 28 enfermos chagásicos asintomáticos (ECh-1), 11 ECh con trastornos mínimos (ECh-2) y 21 ECh con cardiopatía manifiesta (ECh-3). Como grupos controles, se estudiaron 35 sujetos no infectados, 25 normales y 10 con miocardiopatía de etiología no chagásica.

Los exámenes clínicos de los pacientes fueron realizados en el Servicio de Cardiología del Hospital Ramos Mejía de la Municipalidad de la Ciudad de Buenos Aires.

### Obtención de células inmunocompetentes y suero

En todos los casos se obtuvieron muestras de sangre periférica por punción venosa. La sangre extraída fue inmediatamente transferida a tubos estériles con y sin Heparina (Abbot, Argentina) para la posterior separación de células mononucleares y suero respectivamente.

El tubo sin anticoagulante fue incubado a 37°C 3-4 hs para facilitar la retracción del coágulo y <sup>el</sup>centrifugado. El suero sobrenadante fue separado en condiciones de esterilidad, fraccionado en alícuotas de 1 ml, decomplementado por calentamiento (30 min a 56°C), y empleado en el día o conservado a -20°C hasta su uso.

La sangre heparinizada fue tratada según se describiera en el Capítulo anterior hasta el aislamiento de células mononucleares, empleando el gradiente bifásico de den-



sidad que se describiera en el Capítulo 2.

Cultivo de linfocitos: estudio del efecto de distintos sueros

Las células mononucleares periféricas aisladas fueron llevadas a cultivo en las condiciones que se describieran anteriormente, incluyendo las dosis de las distintas preparaciones antigénicas de *T. cruzi* o de tejido homólogo ensayadas.

Para investigar el efecto del suero de pacientes chagásicos (SECh) sobre la respuesta linfoproliferativa se realizaron cultivos paralelos empleando en un caso el suero humano normal ya descrito y, en otro(s), suero del mismo paciente (suero autólogo) y/o de otro ECh (suero alogeneico). En todos los casos se emplearon sueros obtenidos en el mismo día.

Determinación de anticuerpos anti-*T. cruzi*

1- Ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y de hemoaglutinación indirecta (HAI)

Para evaluar la actividad de Acs presentes el SECh, se utilizaron los ensayos de IFI y HAI sobre diluciones seriadas de cada uno de los sueros.

En el ensayo de IFI se utilizan epimastigotes formolados; por lo tanto, su empleo permite evaluar la reactividad de los Acs séricos con la membrana de los parásitos (336); mientras que, para sensibilizar los glóbulos rojos de carnero empleados en el ensayo de HAI, se utilizan Acs citoplasmáticos de *T. cruzi* obtenidos por ruptura del parásito (341).

Por ambas técnicas se estudiaron 36 sueros diluidos desde 1/2 hasta 1/256 (IFI) o hasta 1/2046 (HAI). En ambos



casos se presentan los resultados como el  $\log_2$  de la mayor dilución reactiva, o sea:  $1/2 = 1$ ,  $1/4 = 2$ ,  $1/8 = 3$ , etcétera.

## 2- Ensayos inmunoenzimáticos

Las distintas fracciones subcelulares de *T. cruzi* (F, Mc y CS), preparadas como se describiera en el Capítulo 3, fueron ensayadas como Acs en ensayos inmunoenzimáticos para evaluar los Acs específicos contenidos en el suero de 61 ECh y 25 controles. Los ensayos fueron realizados en placas de poliestireno de 96 (8 x 12) orificios con fondo plano (Dynatech, Virginia, U.S.A.) siguiendo el procedimiento descrito anteriormente (348). La actividad de cada suero fue determinada por duplicado empleando un espectrofotómetro (MicroELISA mini reader MR 590, Dynatech), con los ensayos reactivos y testigos apropiados. Los resultados se expresan por las absorbancias a 490 nm.

## 3- Ensayos de captación para la titulación de IgM específica

Este ensayo se realizó siguiendo la técnica recientemente descrita por Freilij et al (349). Brevemente, diluciones seriadas de suero en PBS (pH 7,8) fueron incubadas 30 min a 37°C en microplacas de poliestireno, de 96 (12 x 8) orificios con fondo en U, presensibilizadas con anti-IgM humana. Después de lavar, se agregó una suspensión de antígenos de Aglutinación Directa, y se incubó 18 hs a 4°C en cámara húmeda. Se define el título reactivo de cada suero como la última dilución cuyo manto de aglutinación cubra el 50% del fondo del orificio, con bordes estrictamente regulares.

## Evaluación de actividades mediadas por anticuerpos



### 1- Actividad citotóxica mediada por anticuerpos (ADCC)

Este ensayo se realizó utilizando leucocitos polimorfonucleares (PMN) humanos de dadores sanos como células efectoras y epimastigotes de cultivo, cepa Tulahuén, como células blanco. La técnica de trabajo siguió un procedimiento ya descrito (213). Brevemente,  $5 \times 10^6$  PMN y  $5 \times 10^5$   $^3\text{H}$ -epimastigotes ( $^3\text{H}$ -Tc) fueron mezclados con dos diluciones distintas de suero en un volumen final de 0,4 ml. Las mezclas de reacción se centrifugaron 10 min a  $350 \times g$  ( $4^\circ\text{C}$ ) y se llevaron a  $28^\circ\text{C}$ . Tres horas después se centrifugó 10 min a  $500 \times g$  ( $4^\circ\text{C}$ ) y se separó 0,2 ml de cada sobrenadante, que fueron transferidos a viales de centelleo y tratados para determinar la radioactividad contenida. Utilizando los controles apropiados, la capacidad para mediar fenómenos citotóxicos de los distintos sueros se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Citotoxicidad(\%)} = \frac{\text{cpm de sobrenadante de reacción}}{\text{cpm de } 5 \times 10^5 \text{ } ^3\text{H-Tc lisados}} \times 100$$

(La lisis total de los  $^3\text{H}$ -Tc se realizó con dodecil sulfato de sodio = SDS).

Las determinaciones fueron realizadas por tubos duplicados, y repetidas empleando células efectoras de distintos dadores. Se consideró positivo a todo suero que mediara la lisis de, por lo menos, el 30% de los parásitos.

### 2- Actividad lítica mediada por anticuerpos

Este ensayo se llevó a cabo incubando los sueros a estudiar, en presencia de complemento (suero humano normal = SHN), con tripomastigotes de sangre de ratón, de acuerdo con un procedimiento ya descrito (150), y el efecto lítico determinado por la disminución del número de pará-



sitos después de la incubación.

Con el fin de evitar la presencia de Acs específicos en la superficie de los tripomastigotes empleados, los parásitos fueron obtenidos de ratones irradiados (600 R) 72 hs antes de la infección.

Los pasos de la reacción fueron, brevemente, los siguientes: volúmenes iguales de suero y de una suspensión de tripomastigotes fueron incubados a 37°C durante 60 min y centrifugados 2,5 min a 3150 x g. El material precipitado fue resuspendido al volumen original y dividido en dos fracciones. Cada una de ellas fue, entonces, incubada 60 min a 37°C con igual volumen de SHN o de SHN inactivado por calentamiento (30 min a 56°C) (SHNi) y el número de parásitos vivos en cada tubo fue cuantificado por observación microscópica.

Cada suero fue ensayado por duplicado y, en la mayoría de los casos, el ensayo se realizó en más de una oportunidad.

El porcentaje de lisis se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Lisis(\%)} = 100 - \frac{\text{N}^\circ \text{ de parásitos después de incubar con SHN}}{\text{N}^\circ \text{ de parásitos después de incubar con SHNi}} \times 100$$

Los resultados se presentan como: suero POSITIVO, todo aquel que lisó más del 25% de los parásitos cada vez que fue ensayado, NEGATIVO todo aquel que nunca logró lisar más del 25% de los parásitos, y OSCILANTE aquel que presentó una capacidad lítica variable en distintos ensayos.

#### Determinación de Acs reactivos con tejido homólogo

##### Ensayo inmunoenzimático (ELISA)

En las mismas condiciones operativas que se describieron con detalle anteriormente, y empleando como Ag el ho-



mogeneizado de miocardio humano, cuya preparación se describiera en el Capítulo 3, se montó una técnica inmune enzimática dirigida a detectar y cuantificar, en términos relativos, Acs reactivos contra tejido homólogo. En esas condiciones se estudiaron 40 ECh y 26 controles sanos.

#### Ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Se investigó la presencia de Acs reactivos contra distintas estructuras del tejido cardíaco de acuerdo con la técnica descrita oportunamente por Khoury et al (293). Brevemente: se incubaron muestras de suero diluido en PBS sobre cortes de aurícula de corazón humano (grupo sanguíneo O), se lavó el tejido y se lo enfrentó con fragmentos  $F(ab')_2$ , de IgG de cabra anti-IgG humana, conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC- $F(ab')_2$ ) (Cappel Lab., Cochranville, U.S.A.) diluidos en PBS.

Los sueros fueron ensayados por duplicado y la inmunofluorescencia resultante fue leída en un microscopio Leiss con epi-iluminación.

En la lectura de los ensayos se distinguieron dos imágenes: una extracelular asociada a una reactividad anti-laminina y denominada EVI, y otra intracelular (IC) asociada a una reactividad contra miosina (350). La intensidad de estas reacciones fue cuantificada con una escala arbitraria: NEGATIVO o Grado 0, LEVE o Grado 1, MODERADO o Grado 2, INTENSO o Grado 3 y MUY INTENSO o Grado 4.



## RESULTADOS Y DISCUSION

### EVALUACION DE MECANISMOS CELULARES Y HUMORALES ANTI- TRYPANOSOMA CRUZI

#### 4.1. Efecto del suero de pacientes chagásicos sobre la respuesta linfoproliferativa

##### 4.1.A. Suero autólogo

La Figura 9 ilustra las diferencias obtenidas al ensayar la estimulación de linfocitos de ECh en suero normal y en suero autólogo. Se muestran allí los resultados apareados de 17 pacientes obtenidos frente al homogenato total de *T. cruzi*. Se observó que predomina una tendencia a menor reactividad en presencia de suero autólogo.

La Tabla 15A presenta los valores medios de todos los ensayos realizados empleando las distintas preparaciones antigénicas de *T. cruzi*. Como puede verse, en todos los casos se obtuvieron estimulaciones medias inferiores en presencia de suero autólogo; aunque las diferencias son estadísticamente significativas sólo en el caso del HT ( $p < 0,001$ ), los índices de estimulación obtenidos en ambos sueros correlacionaron significativamente para HT ( $p < 0,01$ ) y CS ( $p < 0,05$ ).

Cuando se analizaron los resultados agrupando a los pacientes según su estado clínico, se encontró que la correlación entre los índices de estimulación es significativa exclusivamente para el grupo ECh-3 ante el HT ( $n = 9$ ,  $p < 0,01$ ) y está en el límite de significación para ese mismo grupo ante F ( $n = 6$ ) y Mc ( $n = 9$ ) ( $0,05 < p < 0,10$ ) (datos no presentados en tabla).

Otro enfoque para analizar estos resultados es el estudio de las diferencias individuales. Se decidió conside-



rar como diferentes aquellos resultados con discrepancias superiores al 30% entre los valores apareados. Para seleccionar este valor, consideramos que cada dato individual es el resultado de cultivos efectuados por triplicado, que no difieren entre sí en más del 10%, de donde la acumulación de los errores máximos posibles de dos ensayos distintos no puede superar el 20%; a este valor se le sumó un 10% adicional de margen para asegurar que las diferencias son reales.

Bajo estas condiciones se analizaron los resultados para agruparlos en 3 categorías: 1) respuesta inalterada (las diferencias no alcanzan el 30%); 2) respuesta disminuida (la estimulación con suero chagásico es, por lo menos, 30% más baja que con suero normal); y 3) respuesta aumentada (la estimulación con suero chagásico es, por lo menos, 30% más alta que con suero normal).

Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 15B, en la que los ECh se presentan en conjunto y agrupados según su estado clínico, en relación con la estimulación por las distintas preparaciones antigénicas de *T. cruzi*. Esta presentación propone dos niveles de análisis: desde los pacientes y desde los antígenos.

El primer hecho que resalta es que el suero autólogo modifica una proporción significativa de respuestas de los ECh a todos los antígenos: HT = 80%; F = 68%, Mc = 85% y CS = 82%. Esta modificación es preponderantemente inhibidora de la capacidad linfoproliferativa: HT = 23/27 (85%), F = 15/19 (79%), Mc = 20/28 (71%) y CS = 18/28 (64%). Los resultados son menos homogéneos cuando se considera el estado clínico de los pacientes o los antígenos del parásito. Por un lado, nótese que los pacientes del grupo intermedio, con trastornos mínimos (ECh-2), presen-



tan una mayor sensibilidad al suero autólogo que los otros dos grupos ante todas las fracciones antigénicas (F, Mc, y CS); por otro lado, los pacientes cardiopatas (ECh-3) se distinguen de los asintomáticos (ECh-1) tanto con F como con Mc: los ECh-3 "pierden" su capacidad de respuesta linfoproliferativa a F y "ganan" reactividad a los Ags de Mc.

Ante la posibilidad de que estos efectos estuvieran relacionados con mecanismos de reactividad anti-idiotípica, se realizaron ensayos semejantes a los aquí descriptos empleando suero "chagásico" alogeneico.

#### 4.1.B. Suero alogeneico

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 16 y muestran que el suero "chagásico" también disminuye los índices medios de respuesta de células alogeneicas a distintos Ags del parásito. Estas diferencias tienen significación estadística para HT ( $p < 0,02$ ), F ( $p < 0,005$ ) y CS ( $p < 0,02$ ). El efecto es heterogéneo según las fracciones antigénicas: es mayor para CS (11/12 = 92% de respuestas alteradas) y Mc (15/17 = 88%) y menor para F (7/14 = 50%); en todos los casos predomina el carácter inhibidor: (F = 7/7, 100%, Mc = 11/15, 74% y CS = 10/11, 91%).

Los ensayos realizados implicaron la combinación de las actividades inmunes de células y sueros de distintos ECh, por lo que no resulta sencillo relacionar los resultados con el estado clínico de los dadores de unas y otros y, en muchos casos, el número de datos es pequeño.

Las células de ECh-1 dieron, en promedio, menores respuestas linfoproliferativas al HT ( $n = 10$ ,  $p < 0,02$ ), F ( $n = 9$ ,  $p < 0,005$ ) y CS ( $n = 9$ ,  $p < 0,05$ ) en presencia de



suero alogeneico, con una alta proporción de descenso de los índices de estimulación por debajo del 70% del correspondiente valor de referencia: HT = 7/10, F = 7/9, Mc = 8/10 y CS = 7/9.

Los sueros de ECh-1 disminuyeron significativamente la reactividad media de células alogeneicas a F ( $n = 6$ ,  $p < 0,05$ ) y CS ( $n = 6$ ,  $p < 0,05$ ), pero no a Mc ( $n = 9$ ); y una fracción importante de respuestas individuales: HT = 4/9, F = 4/6, Mc = 5/9 y CS = 5/6.

Los resultados presentados hasta ahora demuestran la influencia de factores séricos en la reactividad blastomitogénica de las células de los ECh. La universalidad de este fenómeno queda evidenciada porque fue encontrada en ensayos efectuados con sueros autólogos y alogeneicos, en pacientes con distinto nivel de compromiso clínico y en la respuesta frente a diversos Ags del *T. cruzi*.

Aunque, como ya vimos, los efectos no son exactamente homogéneos, se puede considerar que los resultados obtenidos en la respuesta al HT del parásito son representativos de un fenómeno que puede resumirse así: el suero chagásico modifica significativamente la intensidad de la respuesta celular al *T. cruzi*, el efecto predominante es de inhibición.

Una vez más, el empleo de fracciones subcelulares del parásito permitió hacer evidente la heterogeneidad de la respuesta inmune a distintos Ags del parásito, y su variabilidad respecto del curso de la enfermedad. La respuesta a los Ags de Mc y CS resultó más sensible a la presencia de suero que la dirigida contra F; sin embargo, los efectos sobre la respuesta a F, cuando se presentaron, fueron más homogéneamente inhibidores que los correspondientes a Mc y CS. Esta diversidad se amplía cuan-



do se considera el estado clínico de los pacientes: tanto los ECh-2 como los ECh-3 muestran diferencias con los ECh-1, su respuesta inmune no parece estar regulada de la misma manera y las diferencias en la reactividad a distintas estructuras antigénicas del parásito se magnifican.

En resumen, la reactividad celular de los ECh a los Ags del *T. cruzi* no es independiente de factores humorales. Esta compleja regulación es diferente para los distintos Ags y se modifica con el curso de la enfermedad, como se traduce del estado clínico de los pacientes aquí estudiados.

Para investigar algunos aspectos de la regulación entre respuesta inmune celular y humoral señalada anteriormente, se estudiaron 33 ECh (18 ECh-1, 6 ECh-2 y 9 ECh-3).

La reactividad celular fue evaluada por linfoproliferación en las mismas condiciones que fueran descriptas con amplitud en el Capítulo 3. Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla 17.

Las manifestaciones humorales fueron evaluadas con distintas técnicas. Los sueros se analizaron por hemoaglutinación indirecta e inmunofluorescencia indirecta para investigar los Acs reactivos contra Ags citoplasmáticos y de membrana de *T. cruzi* respectivamente. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 18. Para poder analizar con mayor detalle el perfil de especificidades de los Acs séricos, se desarrollaron ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) dirigidos a determinar Acs reactivos con distintas fracciones subcelulares de *T. cruzi* (F, Mc y CS). Esta elección partió de las siguientes consideraciones:

- 1) la reacción de ELISA había sido previamente desarrollada en nuestro Laboratorio, empleando como antígenos



fracciones subcelulares de *T. cruzi*;

- 2) ELISA presenta una sensibilidad similar al radioinmunoensayo (RIA) para detectar Acs contra parásitos (351), y es tan específica como IFI en la enfermedad de Chagas (352);
- 3) ELISA permite cuantificar los resultados y, adaptada para utilizar las mismas preparaciones antigénicas empleadas en estudios de inmunidad celular, probablemente facilite el hallazgo de relaciones entre los aspectos humorales y celulares de la respuesta inmune.

Los resultados obtenidos con el ensayo de ELISA se presentan en las Figuras 10 y 11. El número de pacientes estudiados con esta técnica supera al presentado anteriormente por razones que se describirán más adelante. Ellas muestran que todas las fracciones subcelulares del parásito revelan la presencia de cantidades significativas de Acs específicos en el suero de ECh.

En la Figura 11 se presenta un hecho que consideramos especialmente relevante: la cantidad de Acs detectados con la fracción Mc es significativamente distinta ( $p < 0,001$ , test t de Student) en ECh asintomáticos y ECh con cardiopatía o, dicho en otros términos, los ECh cardiopatas presentan mayores títulos de Acs frente a Mc que los ECh asintomáticos. Para corroborar este hecho es que agregamos a nuestro estudio una serie adicional de sueros con diagnóstico clínico definido hasta llegar a un total de 61 ECh (35 ECh-1, 12 ECh-2 y 14 ECh-3) y 25 controles. Las diferencias se conservaron y permiten proponer que esta mayor reactividad sérica contra Mc está asociada al desarrollo de manifestaciones patológicas que son características de la enfermedad de Chagas. Consideramos que estos resultados son insuficientes por sí solos para dis-



cutir si este fenómeno es causa o consecuencia de la patología pero, como discutiremos más adelante, son coherentes con otros resultados obtenidos con anterioridad.

Este crecimiento de la reactividad humoral detectable con la fracción Mc de *T. cruzi* trasciende a la comparación singular y parece relacionarse con el conjunto de las reactividades humorales a las distintas fracciones del parásito: la Tabla 19 presenta los resultados de todos los pacientes estudiados, agrupados según sus manifestaciones clínicas, ordenados según las intensidades relativas de reactividad a las distintas fracciones. Nótese que los ECh-1 presentan una pronunciadamente mayor reactividad humoral a CS que a F y Mc; en los ECh-2 disminuye la respuesta a CS, a favor de F permaneciendo Mc como la fracción con menor reactividad relativa. Los ECh-3, en cambio, muestran una tendencia importante a reaccionar con Mc, en mayor medida que con CS y, sobre todo, que con F.

#### 4. Relación entre reactividad celular y humoral

Consideraremos ahora estos resultados en relación con los estudios de respuesta celular de los pacientes descritos en el punto 3.

En resumen, 33 ECh fueron agrupados según su estado clínico y estudiados en ensayos in vitro de reactividad inmune celular y humoral específica a distintas fracciones antigénicas del *T. cruzi*. Las relaciones encontradas se presentan en la Figura 12.

Como puede verse, las reacciones humorales y celulares muestran, en varios casos, una relación inversa de intensidades (de la forma  $y = a \cdot a^{bx}$ ): los anticuerpos reactivos con estructuras de la membrana del *T. cruzi* (determi-



nados por IFI) crecen a medida que disminuye la reactividad celular a F ( $a = 7.8$ ,  $b = -0.02$ ,  $r = 0.66$ ,  $p < 0,01$ ), Mc ( $a = 8.2$ ,  $b = -0.04$ ,  $r = 0.69$ ,  $p < 0,01$ ) y CS ( $a = 8.2$ ,  $b = 0.06$ ,  $r = 0.74$ ,  $p < 0,001$ ).

Todas estas relaciones tienen forma asintótica, y significación estadística, exclusivamente con los resultados de los ECh-1; no pudo demostrarse relación en los otros grupos de ECh. Algo similar se encontró en el mismo grupo de pacientes al relacionar ambos tipos de respuesta contra un mismo conjunto antigénico: reactividades complementarias anti-Mc ( $a = 0.34$ ,  $b = -0.16$ ,  $r = 0.65$ ,  $p < 0,01$ ) y anti-CS ( $a = 0.53$ ,  $b = -0.23$ ,  $r = 0.74$ ,  $p < 0,001$ ).

Los resultados obtenidos también permiten relacionar las distintas técnicas para determinar Acs: la reactividad por IFI y por ELISA correlacionó significativamente, cualquiera que fuese el Ag empleado en el ensayo inmunoenzimático, tanto en el grupo de ECh-1 como en el conjunto de ECh (ver Figura 13).

Antes de admitir como definitivas a estas relaciones, investigamos si la aparente complementación entre mecanismos celulares y humorales estaba vinculada con el tipo de inmunoglobulina que estábamos detectando en los distintos ensayos. Todas las técnicas aplicadas a la determinación de Acs se dirigían a Acs IgG, y no podía descartarse a priori que las diferencias relativas fueran un subproducto de alguna forma de modulación de los distintos tipos de Acs. Por ello investigamos el título de Acs IgM específicos en los sueros. Los resultados, incluidos en la Tabla 18, indican que los Acs IgM específicos están homogéneamente ausentes en estos pacientes.

Estos datos señalan la importancia de la relación in-



versa entre las intensidades de las respuestas celulares y humorales a distintos Ags del *T. cruzi*.

El conjunto de resultados presentados en este Capítulo indica la existencia de mecanismos de regulación, que, significativamente, pudieron ser demostrados en los enfermos chagásicos asintomáticos. Sea cual fuere el o los mecanismos involucrados, y más allá de la causa por la cual en algún porcentaje de pacientes este equilibrio se desplaza, la regulación se modifica o desaparece con la aparición de patología clínicamente detectable.

##### 5. Actividad citotóxica mediada por anticuerpos (ADCC)

Los resultados obtenidos al evaluar la actividad tripanocida mediada por los Acs presentes en los sueros estudiados se presentan en la Tabla 18.

No se encontraron diferencias significativas entre los valores medios de los distintos grupos de pacientes (ECh-1:  $43 \pm 2$ , ECh-2:  $39 \pm 4$ , ECh-3:  $39 \pm 3$ ), mientras que la ADCC fue negativa en 1/12 infectados asintomáticos y 1/7 ECh-3. En estos aspectos, estos resultados concuerdan con datos recientes de otros autores (218).

Todas las evidencias experimentales conocidas indican que los Acs mediadores de los fenómenos de ADCC anti-*T. cruzi* corresponden a la clase IgG (143, 218). Los resultados aquí presentados revelan una correlación estadísticamente significativa entre la intensidad de la ADCC y el título de Acs IgG reactivos con Ags de la membrana del parásito (IFI) ( $r = 0.68$ ,  $p < 0.001$ ).

No encontramos igual relación con los Acs reactivos con Ags citoplasmáticos de *T. cruzi* (determinados por HAI), aunque sí fue posible demostrar relaciones estadísticamente significativas entre la actividad tripanotóxica y



los Acs reactivos contra ciertas estructuras subcelulares del parásito. Los datos, que se presentan en la Figura 14, revelan relaciones lineales entre la capacidad citotóxica y los Acs anti-CS ( $n = 22$ ,  $r = 0.64$ ,  $p < 0,01$ ) por una parte, y los Acs anti-Mc por otra, en este segundo caso, la relación solamente tiene significación para los ECh-1 ( $n = 11$ ,  $r = 0.61$ ,  $p < 0,05$ ).

#### Anticuerpos líticos

La presencia de Acs con capacidad lítica para tripomastigotes de *T. cruzi* fue investigada en el suero de 25 ECh; resultaron positivos 12, negativos 10 y 3 oscilantes.

Si bien no encontramos ninguna relación evidente con los restantes estudios de actividad inmune humoral, debemos destacar dos hechos por discrepar abiertamente con los resultados de otros autores ( ): 1) la mayor positividad de los ECh-3 ( $6/8 = 75\%$ ) que de los ECh-1 ( $5/13 = 38\%$ ) y ECh-2 ( $1/4 = 25\%$ ); 2) la demostración de capacidad lítica en el suero de pacientes tratados previamente con drogas tripanocidas ( $4/7$ ).



## EVALUACION DE REACTIVIDAD CELULAR Y HUMORAL CONTRA TEJIDOS DEL HUESPED

### 1. Efecto del suero sobre la respuesta celular

Aplicando el esquema ya descripto, se cultivaron linfocitos de ECh en presencia de SHN y SECh paralelamente. En 26 pacientes (13 ECh-1, 6 ECh-2 y 7 ECh-3) se ensayó suero autólogo y en 11 (8 ECh-1, 1 ECh-2 y 2 ECh-3) se usó suero homólogo. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 20 y muestran que, in vitro, el suero chagásico modifica la reactividad linfoproliferativa a miocardio homólogo. El efecto es evidente en todas las situaciones estudiadas; las diferencias de estimulación media alcanzan significación estadística para el conjunto de ECh estudiados en presencia de suero autólogo ( $t = 2.24$ ,  $p < 0,05$ ) y para los ECh-1 en presencia de suero alogeneico ( $t = 2.45$ ,  $p < 0,05$ ). El número de respuestas modificadas es proporcionalmente elevado (73%) en ambos casos y el efecto predominante es de inhibición.

Por lo tanto, la reactividad celular anti-tejidos parece estar vinculada a componentes humorales, en un fenómeno semejante al que presentáramos antes, para la respuesta específica al *T. cruzi*. Esto nos sugirió, como paso siguiente, la evaluación de las reactividades celulares y humorales anti-miocardio en un grupo de pacientes.

### 2. Respuestas celular y humoral

Para ello se estudiaron los Acs reactivos con tejido homólogo, a través de ensayos inmunoenzimáticos y de ensayos por IFI para revelar actividades dirigidas contra distintas estructuras antigénicas, y las respuestas pro-



liferativas de linfocitos en cultivo de 33 ECh y 36 controles (18 ECh-1, 6 ECh-2, 9 ECh-3, 26 C-1 y 10 C-2).

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 21.

La reactividad celular a miocardio homólogo, caracterizada en el Capítulo anterior, pudo ser demostrada en 12 de los 32 (38%) ECh estudiados. Esta capacidad de respuesta se presentó en pacientes de todos los grupos clínicos (ECh-1 = 4/17, ECh-2 = 3/6, y ECh-3 = 5/9).

La reactividad humoral contra el mismo homogeneizado de miocardio homólogo, investigada por ELISA, presenta dos características:

- 1) está presente en prácticamente todos (30/33) los ECh estudiados, con una intensidad media ( $0.24 \pm 0.02$ ) significativamente superior ( $p < 0,05$ ) a la de 26 controles sanos (datos individuales no presentados,  $0.08 \pm 0.01$ ) y 10 controles cardiopatas no-chagásicos ( $0.16 \pm 0.02$ );
- 2) su presencia e intensidad, en un modo semejante al que viéramos en la reactividad celular a los mismos Ags, parece independiente del estado clínico de los pacientes. Los valores medios de los distintos grupos son: ECh-1 =  $0.27 \pm 0.03$ , ECh-2 =  $0.17 \pm 0.05$  y ECh-3 =  $0.26 \pm 0.04$ .

La reactividad humoral dirigida contra distintas estructuras de las células de miocardio, demostrada por IFI, corrobora los resultados previos de otros autores (288, 289) tanto en frecuencia de positividad (EVI = 7/31-55%; IC = 13/31-42%) como en la falta de relación entre positividad y estado clínico.

Desde un punto de vista global, los resultados de los distintos ensayos realizados muestran importantes diferencias de reactividad a miocardio entre ECh y controles



sanos. Sin embargo, es importante destacar que las diferencias entre sujetos infectados y no infectados se estrechan cuando se trata de controles con miocardiopatía. Esto replantea un tema para el que no tenemos respuesta: ¿cuán ligados a la infección están los mecanismos de reactividad anti-tejido? ¿hasta dónde son específicos?

### 3. Relaciones entre las respuestas celulares y humorales

El primer hecho que debemos destacar de los distintos estudios realizados es que los resultados de los ensayos dirigidos a conocer las manifestaciones humorales anti-tejido no guardan relación alguna entre sí. Esto sugiere que estudiamos distintos fenómenos y no manifestaciones diversas de una misma reactividad.

El análisis de las respuestas celulares y humorales permitió poner en evidencia una relación inversa (asintótica:  $Acs = a \times LPr^b$ , con  $a$  y  $b$  constantes) entre la intensidad de ambas reacciones. Estas relaciones están ilustradas en la Figura 15. Para la imagen extracelular (EVI,  $a = 2.60$ ,  $b = -0.32$ ,  $r = 0.51$ ,  $p < 0,05$ ) se puede ver que la intensidad de la respuesta proliferativa disminuye cuando crece la intensidad de la imagen fluorescente. Igual perfil se obtiene al considerar los resultados individuales por su carácter de reactividad (positivo-negativo), es decir, sin tener en cuenta la intensidad de la reacción celular a miocardio: 5/13 ECh con EVI negativo, 6/11 con EVI positivo leve o moderado y sólo 1/6 ECh con EVI positivo intenso. Esta relación apareció tanto al considerar el conjunto de ECh estudiados como los resultados del grupo ECh-1, pero no así en los restantes grupos, tal vez por el bajo número de pacientes estudiados.



El mismo fenómeno encontramos al considerar la imagen intracelular (IC,  $a = 1.88$ ,  $b = 0.29$ ,  $r = 0.56$ ,  $p < 0.05$ ) con los datos individuales, y con el carácter de respondedor: 7/17 ECh con IC negativo, 3/5 con IC positivo débil, 2/5 con IC positivo moderado y 0/3 con imagen intensa.

En otras palabras, cualquiera que sea el criterio de análisis de los datos: resultados individuales, valores medios de respuesta o porcentaje de pacientes respondedores, la tendencia resultante es a disminuir la reactividad celular en la medida que crecen algunas manifestaciones de reactividad humoral.

Los resultados obtenidos no muestran relación significativa entre la reactividad celular y humoral al homogeneizado de miocardio. Esto podría explicarse, considerando que las estructuras antigénicas reconocibles en uno y otros sistema podrían no ser las mismas, tanto sea porque naturalmente los mecanismos celulares y humorales reaccionen hacia diferentes epitopes de una misma estructura, como porque el desarrollo de ambas técnicas in vitro haya permitido que sean distintas las estructuras expuestas al reconocimiento inmune.

Por otra parte, las relaciones demostradas sugieren la existencia de un fenómeno muy amplio: vinculan una reactividad celular a un homogeneizado de miocardio, es decir, de una respuesta seguramente policlonal, con reactividades humorales algo más específicas dirigidas contra estructuras extra e intracelulares que, curiosamente en ambos casos, corresponden a proteínas ampliamente distribuidas en el organismo: la laminina y la miosina. Una mayor precisión de estas relaciones deberá ser investigada trabajando con Ags más purificados; pero, aun con esa



limitación, las tendencias complementarias entre los mecanismos humorales y celulares en la reactividad dirigida contra tejidos parecen reproducir el fenómeno que pudimos demostrar en la reactividad al parásito.

Esto sugiere una tendencia común en toda la actividad inmune de los sujetos infectados por el *T. cruzi*.

#### Relaciones entre las reactividades celulares y humorales al *T. cruzi* y a tejidos homólogos

En la última parte del Capítulo anterior dijimos que no parecía haber relación alguna entre la reactividad celular a *T. cruzi* y a miocardio homólogo. Sin embargo, los datos aquí presentados permiten vincular la estimulación inmune debida al parásito y al organismo del huésped.

La Tabla 22 presenta los resultados de la evaluación de Acs anti-distintas fracciones subcelulares del *T. cruzi* en relación con la reactividad humoral anti-miocardio. Como puede verse, existe una significativa asociación entre la reactividad humoral a la fracción CS de *T. cruzi* y la presencia de imágenes extracelulares ( $p < 0,05$ ) e intracelulares ( $p < 0,01$ ) de reacción a miocardio. Más aun, en este último caso existe una correlación significativa entre la intensidad de ambas reacciones ( $p < 0,01$ ).

Con este último enfoque resultó significativa la correlación entre la reactividad, por ELISA, a miocardio y a la fracción Mc de *T. cruzi* ( $p < 0,05$ ), especialmente en el grupo asintomático (ECh-1,  $p < 0,01$ ).

Cuando analizamos la reactividad celular a *T. cruzi* en relación con la reactividad humoral a miocardio, encontramos las relaciones ilustradas en la Figura 16: en la medida en que se positiviza y/o intensifica la actividad



humoral anti-miocardio demostrable por inmunofluorescencia, disminuye la respuesta celular in vitro a F (EVI, ECh-1,  $p < 0,05$ ), CS (EVI, ECh,  $p < 0,05$ ) y Mc (IC, ECh-1,  $p < 0,05$ ).

En consecuencia, nótese que, más allá de un análisis detallado e hipotético sobre el significado biológico de cada una de estas asociaciones, hemos encontrado relaciones que, con distinto grado de significación particular, permiten vincular en términos globales diversas manifestaciones de inmunidad anti-parásito con manifestaciones igualmente diversas de actividad inmune anti-tejidos.

Estas relaciones son especial pero no exclusivamente demostrables en los pacientes asintomáticos lo que sugiere, como otros resultados anteriormente presentados, que no es equivalente el estado inmunológico de pacientes asintomáticos y de pacientes con manifestaciones evidentes de compromiso tisular.



### CONCLUSIONES

Los resultados presentados demuestran que en los enfermos chagásicos crónicos algunos fenómenos celulares y humorales involucrados en la respuesta inmune al *T. cruzi* y en la reactividad anti-tejido están profundamente vinculados entre sí.

El suero "chagásico" alteró significativamente la capacidad de respuesta linfoproliferativa específica a distintos Acs del *T. cruzi*, independientemente del estado clínico del paciente. El efecto es especialmente notable con las fracciones Mc y CS para el conjunto de ECh estudiados mientras que, con F, se ve especialmente en los ECh-3.

El estudio de los sueros mostró que todas las fracciones del parásito revelan importantes niveles de Acs específicos. En particular, Mc mostró ser capaz de distinguir de entre los pacientes aquéllos con un severo compromiso cardíaco. Además, el perfil de reactividad humoral a las distintas fracciones difiere según el estado clínico de los pacientes: en los ECh-1 predominan los Acs dirigidos contra CS mientras en los ECh-3 son más abundantes, en términos relativos, los Acs reactivos con Mc.

Al estudiar la relación entre las reactividades humorales y celulares se pudo hacer evidente que estos no son fenómenos independientes: las relaciones de intensidad inversa entre el contenido de Acs y la respuesta linfoproliferativa a las distintas fracciones subcelulares de *T. cruzi* ensayadas sugieren que los fenómenos celulares y humorales son complementarios. Este hecho podría interpretarse considerando que la capacidad defensiva de un huésped infectado estaría regulada a un cierto nivel global, independientemente de la potencia relativa de sus



distintos componentes. Así, es llamativo que esta relación no haya podido ser demostrada en los pacientes con compromiso patológico manifiesto.

El estudio de algunos mecanismos mediados por Acs reveló relaciones entre actividad citotóxica y la cantidad de ciertos Acs: los dirigidos contra la membrana del parásito, o contra ciertas fracciones subcelulares de éste (Mc y CS).

Considerando los antecedentes presentados en el Capítulo 1, y nuestros resultados al estudiar la reactividad anti-tejido (Capítulo 3), podemos dar por demostrada la existencia de mecanismos inmunes autorreactivos en la Enfermedad de Chagas.

En este Capítulo, hemos dirigido nuestra investigación al estudio de la amplitud de esta reactividad y a sus vinculaciones con la respuesta inmune al *T. cruzi* de los pacientes crónicos.

Mostramos antes (Capítulo 3) que existe reactividad celular al tejido cardíaco; agregamos ahora que hay alguna forma de regulación humoral sobre esta reactividad. Aunque nuestros resultados no alcanzan para explicar cuál o cuáles factores séricos son los responsables de este fenómeno, significativamente demuestran que la reactividad celular decrece en la medida en que crecen algunos Acs con especificidad para miocardio. También se demostró que algunas manifestaciones de reactividad anti-tisular están vinculadas con la reactividad al parásito o, más precisamente, a algunas fracciones subcelulares del parásito; por ejemplo, y para citar sólo las relaciones más conspicuas: los Acs dirigidos contra Mc y contra miocardio, los Acs dirigidos contra CS y contra la miosina contenida en células de miocardio. Estas relaciones mos-



traron significación estadística al considerar los resultados de todos los ECh estudiados; otras relaciones igualmente significativas sólo pudieron ser demostradas en los ECh asintomáticos.

Todos estos datos permiten proponer las siguientes conclusiones:

- 1) los ECh tienen distintos mecanismos inmunes activos dirigidos contra estructuras tisulares;
- 2) estos mecanismos están parcialmente relacionados entre sí,
- 3) y están vinculados con la respuesta al parásito;
- 4) así como en la reactividad al *T. cruzi* encontramos diferencias entre pacientes asintomáticos y pacientes con compromiso orgánico manifiesto, también en la reactividad anti-tejido hay diferencias.

En términos generales, las relaciones entre las distintas manifestaciones de actividad inmune son más evidenciadas en los ECh-1 que en los ECh-3. Aunque en nuestro trabajo el menor número de ECh-3 podría resultar insuficiente para revelar ciertas tendencias, en nuestra opinión, la verdadera causa de esta diferencia reside en que, inmunológicamente, estos pacientes son tan distintos de los ECh-1 como lo son clínicamente. Los resultados obtenidos en este trabajo no permiten aseverar cuál de estos aspectos es causa y cuál es consecuencia, pero el hecho evidente es que hay cambios en la regulación de la respuesta inmune de manera tal que aparece "organizada" en los ECh-1 y muy poco "correlacionada" en los ECh-3.



Figura 9

DIFERENCIAS EN LA ESTIMULACION IN VITRO DE LINFOCITOS DE ENFERMOS CHAGASICOS (ECh) POR LA PRESENCIA DE SUERO AUTOLOGO

EJEMPLO DE RESPUESTAS OBTENIDAS EN 17 ECh ASINTOMATICOS ANTE EL HOMOGENATO TOTAL DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

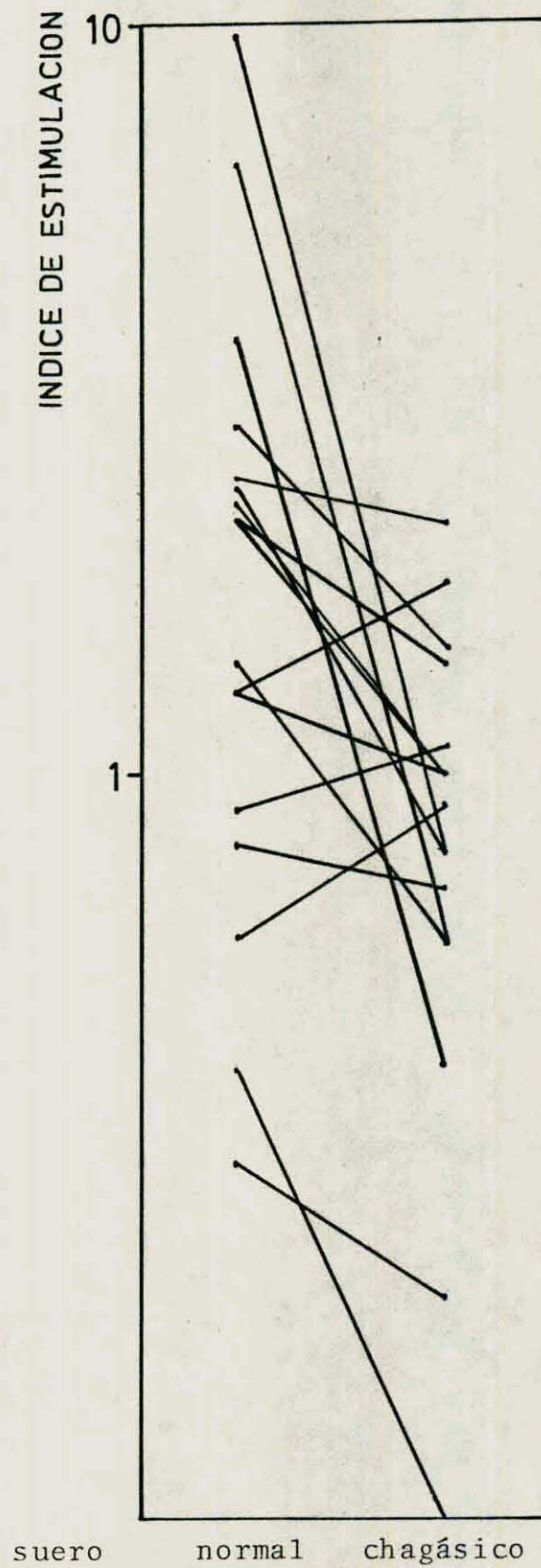




Tabla 15A

EFFECTO DEL SUERO AUTOLOGO SOBRE EL INDICE DE ESTIMULACION  
BLASTOMITOGENICO IN VITRO DE LINFOCITOS DE ENFERMOS  
CHAGASICOS CRONICOS EN PRESENCIA DE FRACCIONES ANTIGENICAS  
DE *T. CRUZI*

Antígenos <sup>a</sup>	n	Suero normal	Suero autólogo
HT	34	2.6 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	1.0 $\pm$ 0.1 <sup>c,d</sup>
F	28	2.4 $\pm$ 0.4	1.2 $\pm$ 0.1
Mc	33	2.0 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.1
CS	34	2.3 $\pm$ 0.3	1.6 $\pm$ 0.1 <sup>d</sup>

a: HT, F, Mc y CS = preparaciones de *T. cruzi*, ver texto

b: los datos se presentan como  $\bar{x} \pm$  ES de los índices de estimulación de los cultivos en suero humano normal y suero autólogo

c: test de Student para muestras apareadas;

HT:  $p < 0,001$

d: estudio de correlación de datos apareados ( $y = a+bx$ )

HT:  $p < 0,01$ , CS  $p < 0,05$



Tabla 15B

EFFECTO DEL SUERO AUTOLOGO SOBRE LA RESPUESTA LINFO-  
 PROLIFERATIVA IN VITRO<sup>a</sup> EN ENFERMOS CHAGASICOS CRONICOS  
 AGRUPADOS SEGUN SU ESTADO CLINICO

	ECh <sup>b</sup>	n	Inalterada <sup>c</sup>	Disminuida	Aumentada
HT	1	17	3 (18%)	12 (71%)	2 (11%)
	2	8	1 (12%)	6 (75%)	1 (13%)
	3	9	3 (33%)	5 (55%)	1 (12%)
	Total	34	7 (21%)	23 (68%)	4 (12%)
F	1	15	5 (33%)	8 (53%)	2 (14%)
	2	7	4 (57%)	2 (29%)	1 (14%)
	3	6	0 (0%)	5 (83%)	1 (17%)
	Total	28	9 (32%)	15 (54%)	4 (14%)
Mc	1	16	3 (19%)	10 (62%)	3 (19%)
	2	8	0 (0%)	6 (75%)	2 (25%)
	3	9	2 (44%)	4 (44%)	3 (34%)
	Total	33	5 (15%)	20 (60%)	8 (25%)
CS	1	16	4 (25%)	7 (44%)	5 (31%)
	2	9	0 (0%)	7 (78%)	2 (22%)
	3	9	2 (22%)	4 (45%)	3 (33%)
	Total	34	5 (18%)	18 (53%)	10 (29%)

a: según la comparación de los índices de estimulación  
 obtenidos en suero humano normal y en suero autólogo

b: ver criterios clasificación en Tabla 5

c: se consideró INALTERADA todo par de respuestas que difireren en hasta un 30% de estimulación, DISMINUIDA cuando el cultivo en suero autólogo fue, por lo menos, un 30% menos estimulado, y AUMENTADA cuando, por lo menos, un 30% más estimulado



Tabla 16

EFFECTO DEL SUERO ALOGENEICO SOBRE LA RESPUESTA LINFO-  
PROLIFERATIVA IN VITRO A DISTINTOS ANTIGENOS DE *T. CRUZI*  
EN ENFERMOS CHAGASICOS CRONICOS

	HT	F	Mc	CS
N° de ensayos	16	14	17	12
IE <sup>a</sup> SHN	1.7 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	1.7 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup>	1.6 $\pm$ 0.1	1.9 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>
SALo	1.1 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.1
resp. <sup>d</sup> inalter.	4 (25%)	7 (50%)	2 (12%)	1 (8%)
dismin.	10 (62%)	7 (50%)	11 (65%)	10 (84%)
aumen.	2 (13%)	0	4 (23%)	1 (8%)

a: los datos se presentan como  $\bar{x} \pm$  ES de los índices de estimulación de los cultivos en suero humano normal (SHN) y suero alogeneico (SALo)

Análisis estadístico (test de Student para muestras apareadas); diferencias significativas:

b:  $p < 0,02$

c:  $p < 0,005$

d: se consideró INALTERADA todo par de respuestas que difieran en hasta un 30% de estimulación, DISMINUIDA cuando el cultivo en suero alogeneico fue, por lo menos, un 30% menos estimulado, y AUMENTADA cuando, por lo menos, un 30% más estimulado



Tabla 17

RESULTADOS DE ENSAYOS DE LINFOPROLIFERACION<sup>a</sup> CON ANTIGENOS DE *T. CRUZI*<sup>b</sup> EN 33 ENFERMOS CHAGASICOS (ECh)<sup>c</sup>

ECh	HT	F	Mc	CS	<i>T. cruzi</i> <sup>d</sup>
101	1.7	0.3	8.2	0.6	1
102	2.3	S.D.	3.4	1.2	1
103	0.8	1.2	0.8	1.4	0
104	1.3	2.2	0.6	1.2	1
105	0.9	1.3	1.1	0.8	0
106	0.6	1.0	1.1	0.8	0
107	2.4	0.6	1.1	0.6	1
108	1.5	0.8	2.6	1.5	1
109	2.2	2.1	2.1	1.0	1
110	2.3	S.D.	1.9	2.0	1
111	0.4	1.4	0.6	0.2	0
112	2.2	1.8	2.0	1.9	1
113	2.9	2.0	2.2	2.7	1
114	6.6	16.5	8.1	7.6	1
115	1.9	2.6	3.8	1.5	1
116	5.5	1.3	1.9	0.8	1
117	1.2	S.D.	2.3	0.8	1
118	1.1	0.6	0.8	1.6	0
201	1.5	0.6	1.3	4.5	1
202	3.2	0.9	0.7	2.3	1
203	1.0	0.9	0.8	0.9	0
204	4.5	1.8	2.8	3.1	1
205	1.4	0.6	1.4	1.3	0
206	1.4	1.8	3.0	2.0	1
301	11.7	6.4	4.4	18.0	1
302	4.1	S.D.	2.3	2.0	1
303	1.1	S.D.	0.7	0.8	0
304	1.2	2.0	2.0	2.0	1
305	5.1	4.7	3.4	2.9	1
306	0.9	2.1	1.6	0.5	1
307	1.9	2.0	2.2	2.0	1
308	1.1	1.4	0.5	0.8	0
309	6.2	3.2	8.0	5.3	1

a: los resultados se expresan como Indice de Estimulación debida a la presencia de Ags

b: Ags ensayados: Homogenato total (HT) y fracciones flagelar (F), microsomal (Mc) y citoplasmática soluble (CS) de *T. cruzi*

c: agrupados según criterios presentados en Tabla 5 en Asintomáticos (1i), con Trastornos Leves (2i) y Cardiopatías (3i)

d: Respondedor 1 si demostró reactividad a, por lo menos, 1 Ag de *T. cruzi*. En caso contrario, No Respondedor = 0



Tabla 18

ANTICUERPOS ANTI-*TRYPANOSOMA CRUZI*<sup>a</sup> EN 33 ENFERMOS  
CHAGASICOS CRONICOS<sup>b</sup>

ECh	IFI	HAI	CAP	ADCC	LISIS
101	6	6	0	SD	SD
101	6	6	0	SD	SD
102	8	6	0	28	SD
103	8	10	4	48	SD
104	8	9	0	47	negativo-0
105	8	11	0	40	negativo-0
106	8	5	1	48	SD
107	8	6	0	48	SD
108	8	11	0	SD	positivo-1
109	8	11	1	39	SD
110	7	5	1	SD	negativo-0
111	8	9	1	50	positivo-1
112	7	7	0	40	negativo-0
113	7	SD	0	SD	SD
114	5	3	0	31	oscilante
115	8	8	2	52	.positivo-1
116	8	10	1	48	.positivo-1
117	8	8	1	SD	negativo-0
118	8	7	SD	SD	SD
201	8	6	SD	39	SD
202	4	5	SD	32	positivo-1
203	8	6	1	SD	SD
204	7	10	0	48	negativo-0
205	7	8	1	47	oscilante
206	6	8	0	31	negativo-0
301	8	11	0	38	SD
302	5	11	0	SD	positivo-1
303	6	10	0	44	negativo-0
304	6	8	0	32	positivo-1
305	7	6	SD	46	SD
306	7	10	SD	48	positivo-1
307	8	9	0	SD	positivo-1
308	7	9	0	27	positivo-1
309	6	7	1	40	positivo-1

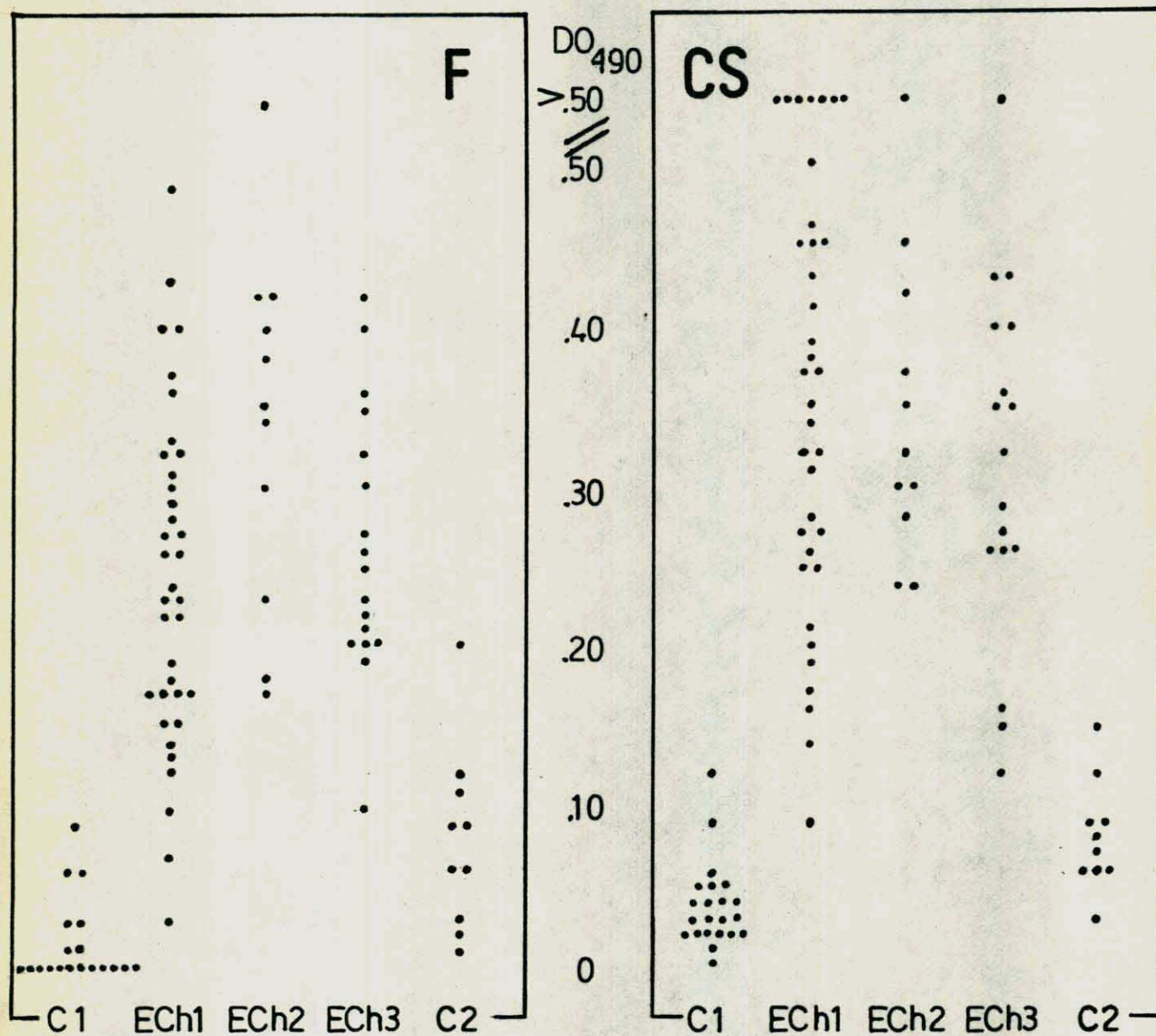
a: los resultados se presentan como el Log<sub>2</sub> de la inversa de la mayor dilución reactiva (ensayos de inmunofluorescencia indirecta = IFI, de hemoaglutinación indirecta = HAI, y de captación de IgM = CAP). La citotoxicidad (ADCC) se expresa como el % de epimastigotes muertos por leucocitos PMN normales en presencia de cada suero (1/100). Ver criterio de Lisis en texto.

b: ver criterio de presentación en Tabla 17.



ANTICUERPOS SERICOS ANTI-T.CRUZI REVELADOS POR LAS  
FRACCIONES FLAGELAR (F) Y CITOPLASMATICA SOLUBLE (CS)  
DEL PARASITO EN ENSAYOS INMUNOENZIMATICOS (ELISA) DE  
64 ENFERMOS CHAGASICOS CRONICOS Y 32 CONTROLES<sup>a</sup>

139



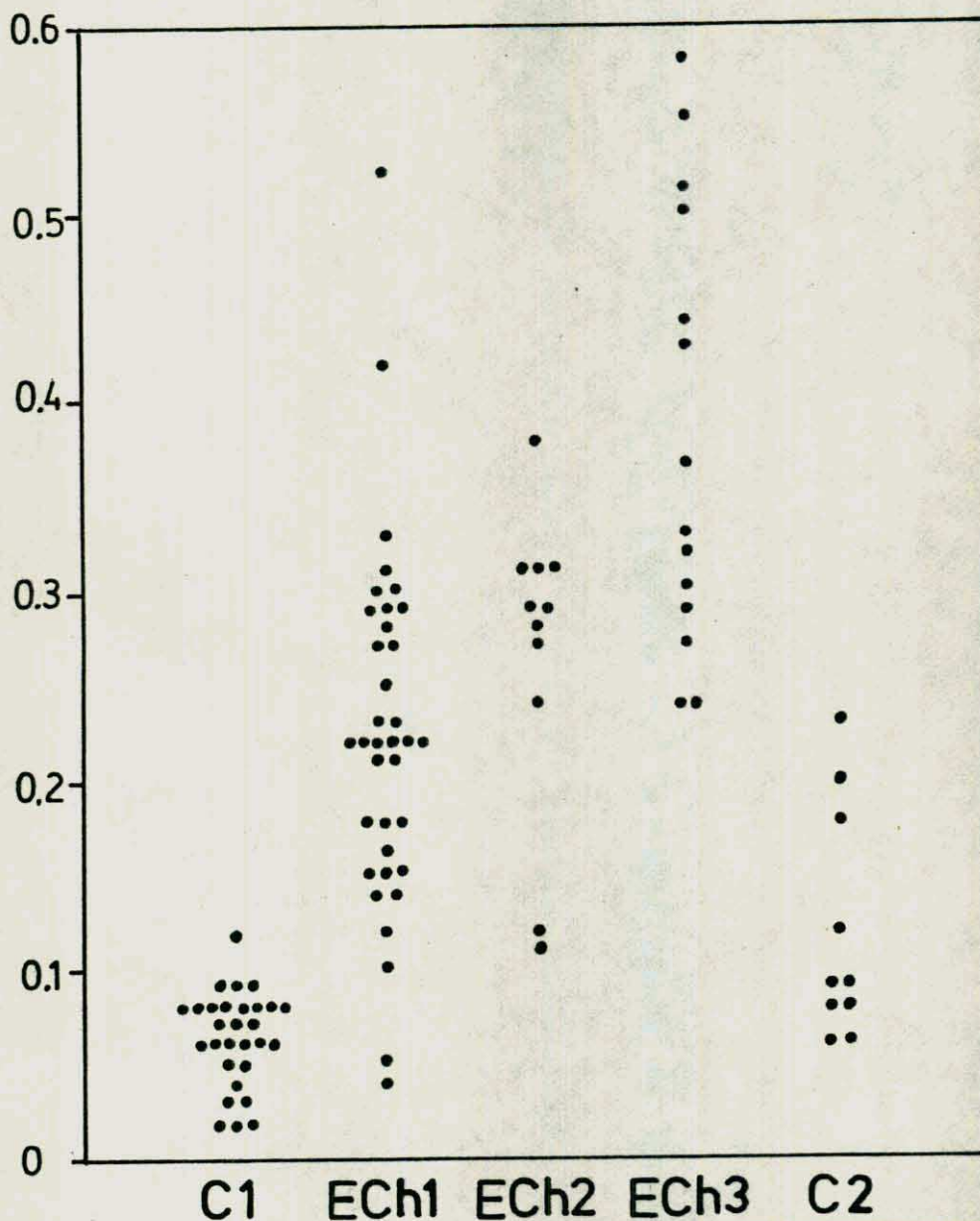
a: ver criterios de clasificación en Tabla 5



Figura 11

ANTICUERPOS ANTI-FRACCION MICROSOMAL DE *TRYPANOSOMA CRUZI*  
DETERMINADOS POR ELISA EN 61 ENFERMOS CHAGASICOS CRONICOS  
Y 39 CONTROLES

DO<sub>590 nm</sub>



$\bar{x} \pm DS$	C1	Ech1	Ech2	Ech3	C2
	.07 ± .01	.24 ± .01	.25 ± .03	.37 ± .03	.12 ± .01

Análisis estadístico (test t de Student): C1 vs. Ech-1  
p < 0,001, Ech-1 vs. Ech-3 p < 0,001



Tabla 19

VARIABILIDAD DEL PERFIL DE REACTIVIDAD HUMORAL A  
DISTINTAS FRACCIONES SUBCELULARES DE *TRYPANOSOMA CRUZI*  
EN LA ENFERMEDAD DE CHAGAS CRONICA

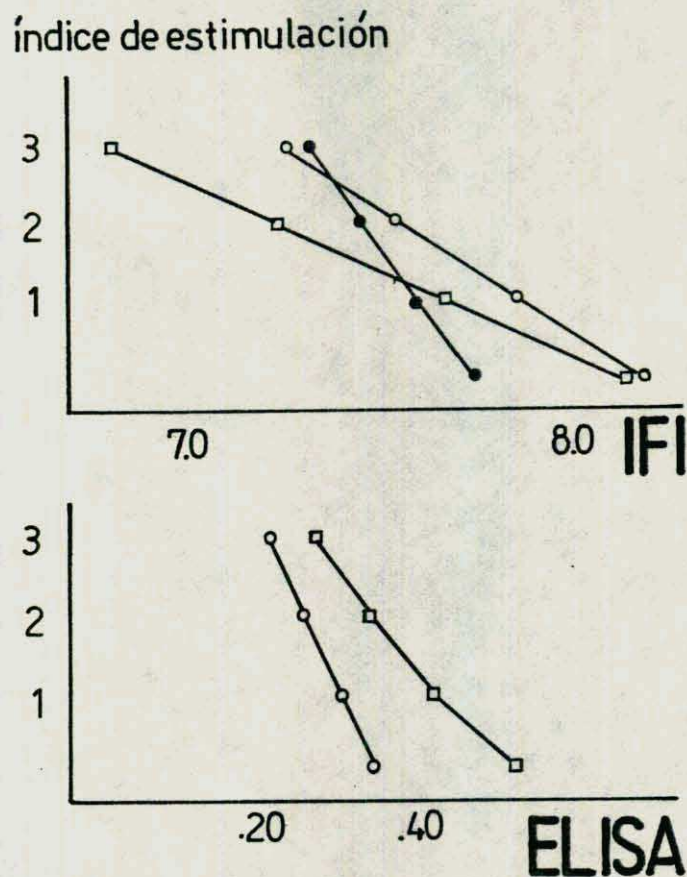
		Intensidad relativa de reactividad <sup>a</sup>		
		Mayor	Intermedia	Menor
ECh - 1	F	4 (11%)	16 (44%)	16 (44%)
	Mc	2 (6%)	14 (39%)	20 (55%)
	CS	30 (83%)	6 (17%)	0 (0%)
ECh - 2	F	6 (50%)	3 (25%)	3 (25%)
	Mc	1 (8%)	2 (17%)	9 (75%)
	CS	5 (42%)	7 (58%)	0 (0%)
ECh - 3	F	5 (29%)	3 (18%)	9 (53%)
	Mc	10 (59%)	2 (12%)	5 (29%)
	CS	2 (12%)	12 (70%)	3 (18%)

Los Acs séricos revelados por ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) empleando distintas fracciones subcelulares de *T. cruzi* como antígenos fueron ordenados para cada paciente en orden decreciente de intensidad. Los datos de 36 ECh fueron agrupados según las distintas secuencias y según su estado clínico. En cada caso se presenta el número (%) de pacientes



Figura 12

RELACION ENTRE LA INTENSIDAD DE LA RESPUESTA LINFOPROLIFERATIVA<sup>a</sup> A DISTINTAS FRACCIONES DE *TRYPANOSOMA CRUZI*<sup>b</sup> Y LA CONCENTRACION DE ANTICUERPOS ESPECIFICOS<sup>c</sup> EN 18 ENFERMOS CHAGASICOS ASINTOMATICOS<sup>d</sup>



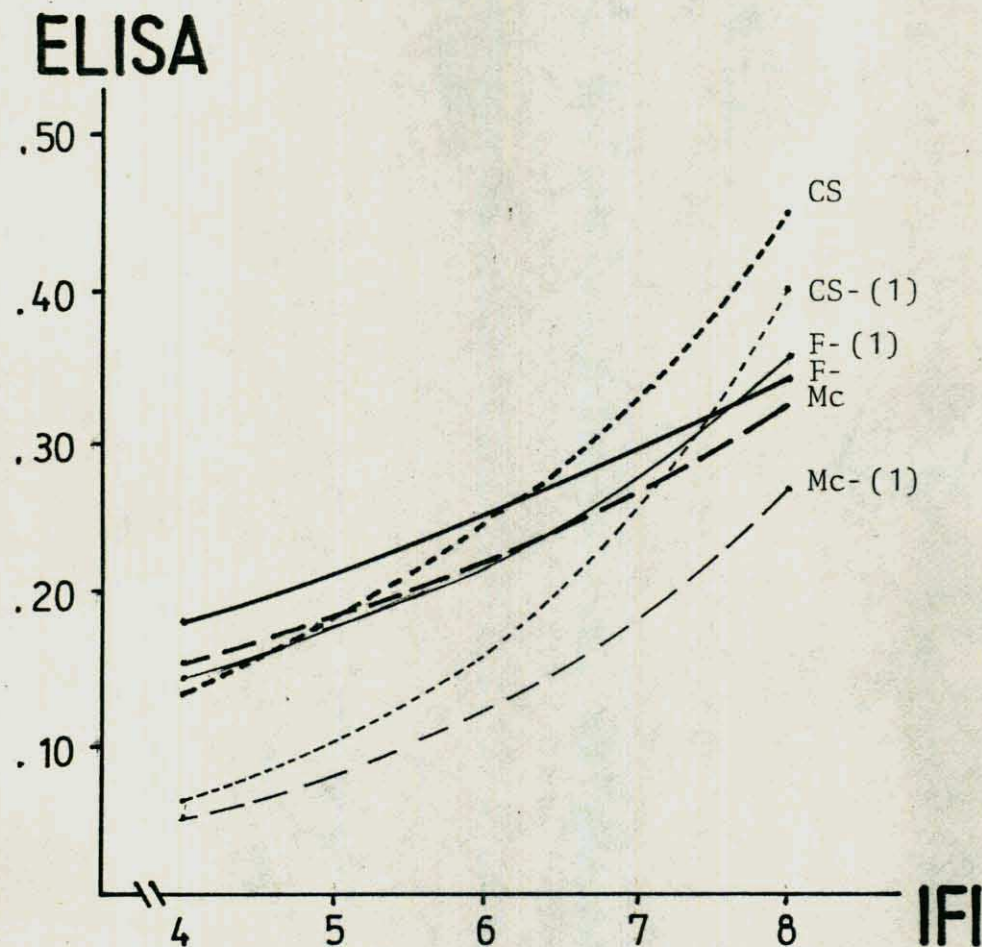
(a) expresada como índice de estimulación (IE); (b) flagelar (—●—), microsomal (—○—) y citoplasmática soluble (—□—); (c) reactivos con la membrana de epimastigotes (IFI) o con las precipitadas fracciones subcelulares de *T. cruzi* empleadas como antígenos en ensayos inmunoenzimáticos (ELISA); (d) ver criterio en Tabla 5

Se presentan relaciones del tipo  $y = ae^{bx}$  en ambos gráficos: IE-F vs. IFI ( $n=15$ ,  $r=0.657$ ,  $p < 0,01$ ), IE-Mc vs. IFI ( $n=18$ ,  $r=0.686$ ,  $p < 0,01$ ), IE-CS vs. IFI ( $n=18$ ,  $r=0.742$ ,  $p < 0,001$ ), IE-Mc vs. ELISA-Mc ( $n=18$ ,  $r=0.652$ ,  $p < 0,001$ ) e IE-CS vs. ELISA-CS ( $n=18$ ,  $r=0.741$ ,  $p < 0,001$ )



Figura 13

RELACION ENTRE LAS CANTIDADES DE ANTICUERPOS ESPECIFICOS  
DETECTADOS POR INMUNOFUORESCENCIA INDIRECTA (IFI) Y  
ENSAYOS DE INMUNOABSORCION SOBRE DISTINTAS FRACCIONES  
SUBCELULARES DE *T. CRUZI* EN 33 ENFERMOS CHAGASICOS CRONICOS



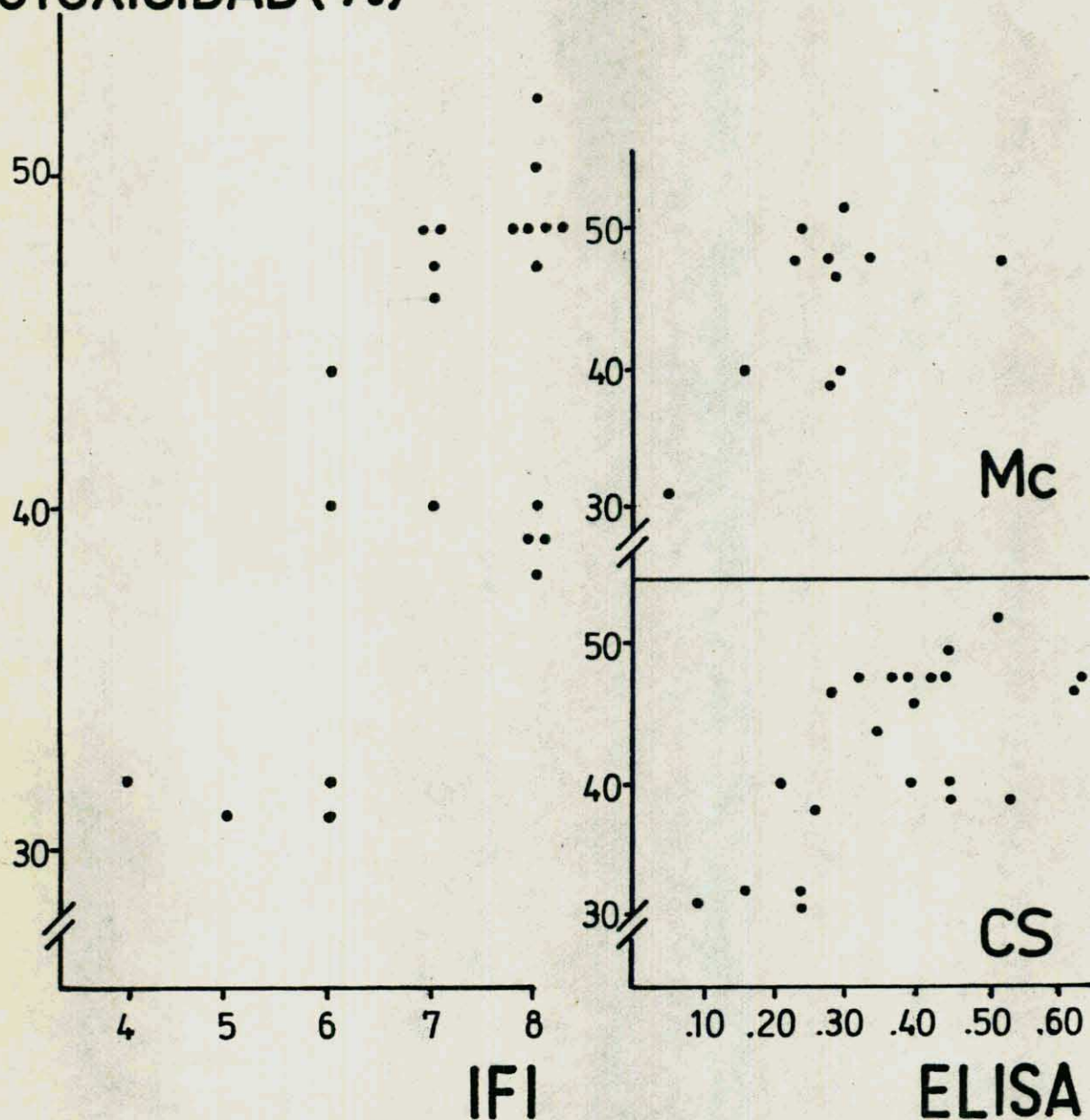
Se presentan las curvas de correlación ( $y=a.e^{bx}$ ) entre las concentraciones de Acs detectados por IFI ( $\log_2$  de la inversa del título) y por ELISA (DO.a 490 nm) empleando como Ags: F (ECh-1 —, ECh —), Mc (ECh-1 — — —, ECh — — —) y CS (ECh-1 ---, ECh .....)



Figura 14

CAPACIDAD CITOTOXICA MEDIADA POR ANTICUERPOS DE RELACION  
CON LA CONCENTRACION DE ANTICUERPOS ESPECIFICOS EN LA  
ENFERMEDAD DE CHAGAS CRONICA

CITOTOXICIDAD(%)



Se presenta el % de epimastigotes de *T. cruzi* muertos por acción de cada suero en relación con el título de Acs detectables por IFI (como  $\text{Log}_2$  de la inversa de la mayor dilución positiva) y la concentración de Acs detectable por ELISA usando las fracciones Mc y CS de *T. cruzi* como Ags (DO.a 490 nm), en 11 ECh-1 (Mc,  $p < 0,05$ ) ó 22 ECh (CS,  $p < 0,01$ ; IFI,  $p < 0,001$ )



Tabla 20

EFFECTO DEL SUERO DE PACIENTES CHAGASICOS SOBRE LA  
RESPUESTA LINFOPROLIFERATIVA A MIOCARDIO HUMANO NORMAL

	N°	ECh-1	N°	ECh
Estimulación en suero normal	13	2.9 $\pm$ 0.7	26 <sup>a</sup>	3.2 $\pm$ 0.6*
Suero autólogo		1.7 $\pm$ 0.3		1.6 $\pm$ 0.2
Respuestas <sup>c</sup> :				
inalteradas		3 (23%)		7 (27%)
disminuidas		7 (54%)		14 (54%)
aumentadas		3 (23%)		5 (19%)
Estimulación en suero normal	8	2.4 $\pm$ 0.5*	11 <sup>b</sup>	2.0 $\pm$ 0.4
Suero alogeneico		1.0 $\pm$ 0.2		1.1 $\pm$ 0.1
Respuestas:				
inalteradas		3 (37%)		3 (27%)
disminuidas		5 (63%)		6 (55%)
aumentadas		0		2 (18%)

a: 13 ECh-1, 6 ECh-2 y 7 ECh-3

b: 8 ECh-1, 1 ECh-2 y 2 ECh-3

c: INALTERADA = diferencias de estimulación en SHN y SECh inferiores al 30%, DISMINUIDA = estimulación en SECh por lo menos 30% menor que en SHN, y AUMENTADA = estimulación en SECh más de un 30% mayor que en SHN

\*  $p < 0,05$



Tabla 21

REACTIVIDAD CELULAR Y HUMORAL A TEJIDO HOMOLOGO EN 33  
ENFERMOS CHAGASICOS CRONICOS

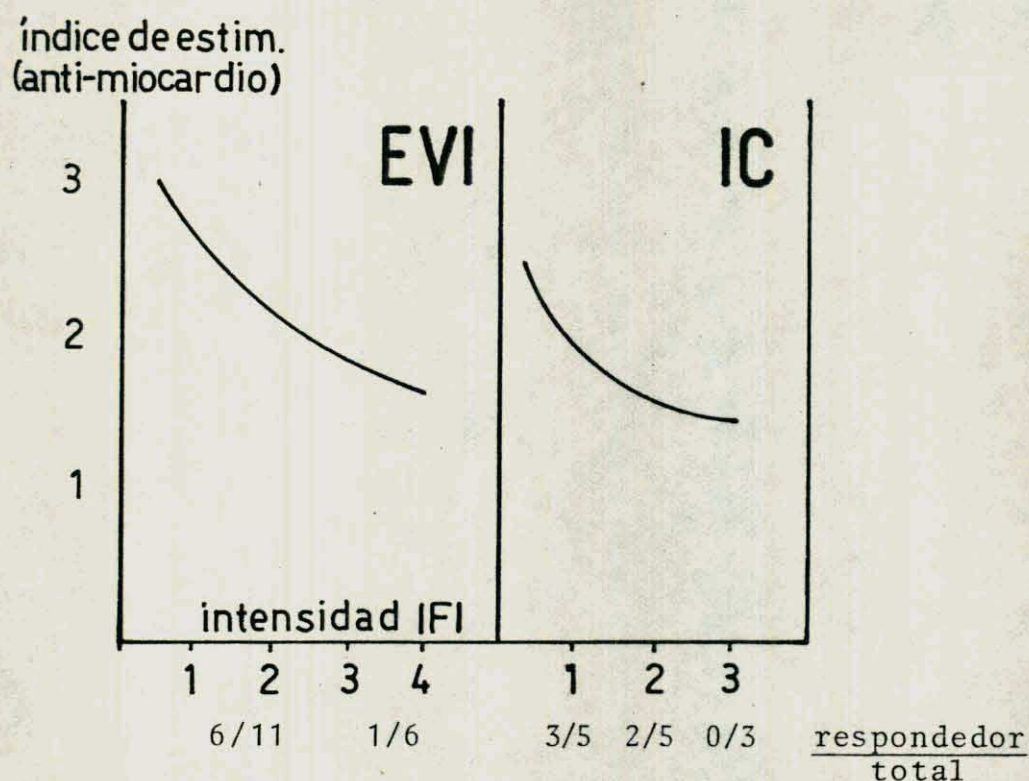
ECh	LPr	ELISA	EVI	IC
101	0.9	.31	4	0
102	1.3	.11	0	0
103	1.8	.23	2	2
104	0.6	.51	3	3
105	1.8	.40	1	0
106	1.5	.52	3	1
107	1.3	.37	SD	SD
108	5.4	.35	2	0
109	1.5	.19	1	1
110	1.8	.15	1	1
111	1.9	.36	0	0
112	0.2	.31	0	2
113	1.2	.24	2	0
114	14.0	.17	0	0
115	3.0	.16	2	2
116	2.5	.14	3	1
117	SD	.11	0	0
118	0.8	.20	4	2
201	10.7	.39	1	0
202	2.5	.15	0	0
203	0.8	.08	0	3
204	3.1	.15	0	0
205	1.8	.08	4	0
206	0.5	.07	0	0
301	7.4	.38	2	0
302	1.7	.30	0	0
303	0.7	.37	0	0
304	1.2	.20	0	0
305	10.8	.38	0	0
306	3.7	.09	SD	SD
307	2.3	.30	2	2
308	1.2	.14	2	3
309	7.4	.17	0	1

Treinta y tres ECh, clasificados según su estado clínico en Asintomáticos (101 a 118), con Trastornos Leves (201 a 206) y Cardiópatas (301 a 309) fueron estudiados con ensayos de Linfoproliferación (LPr) -para evaluar reactividad celular- y ELISA e inmunofluorescencia extracelular (EVI) e intracelular (IC) -para evaluar reactividad humoral- frente a preparaciones de miocardio alogeneico



Figura 15

RELACIONES ENTRE LAS INTENSIDADES DE LAS REACCIONES  
CELULARES Y HUMORALES A MIOCARDIO HOMOLOGO EN  
ENFERMOS CHAGASICOS CRONICOS



Se presentan las curvas de correlación ( $y = a x^b$ ) entre los índices de estimulación y la intensidad de las imágenes inmunofluorescentes extra (EVI,  $n=17$ ,  $p < 0,05$ ) e intra-celular (IC,  $n=13$ ,  $p < 0,05$ ) ante miocardio alogeneico, en ECh con probada reactividad humoral anti-tejido



Tabla 22

ANTICUERPOS ANTI-*TRYPANOSOMA CRUZI* EN RELACION CON LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS ANTI-MIOCARDIO EN 31 ENFERMOS CHAGASICOS CRONICOS

<i>T. cruzi</i> <sup>a</sup>	EVI <sup>b</sup>		IC <sup>b</sup>	
	neg (n = 14)	pos (n = 17)	neg (n = 18)	pos (n = 13)
F	0.30 <sup>±</sup> 0.04	0.31 <sup>±</sup> 0.02	0.30 <sup>±</sup> 0.03	0.32 <sup>±</sup> 0.04
Mc	0.28 <sup>±</sup> 0.04	0.29 <sup>±</sup> 0.03	0.28 <sup>±</sup> 0.03	0.30 <sup>±</sup> 0.03
CS	0.32 <sup>±</sup> 0.04	0.41 <sup>±</sup> 0.04 <sup>c</sup>	0.32 <sup>±</sup> 0.03	0.44 <sup>±</sup> 0.03 <sup>d,e</sup>

a: se presentan los valores medios ( $\bar{x} \pm DS$ ) de los resultados obtenidos por ELISA empleando como Ags distintas fracciones subcelulares de *T. cruzi* (F, Mc y CS) de 31 ECh, agrupados según sus reacciones a miocardio homólogo, en positivos (pos) y negativos (neg)

b: EVI = imagen extracelular, IC = imagen intracelular de reactividad sérica anti-miocardio evaluada por inmunofluorescencia

Análisis estadístico (test t de Student):

c:  $p < 0,05$

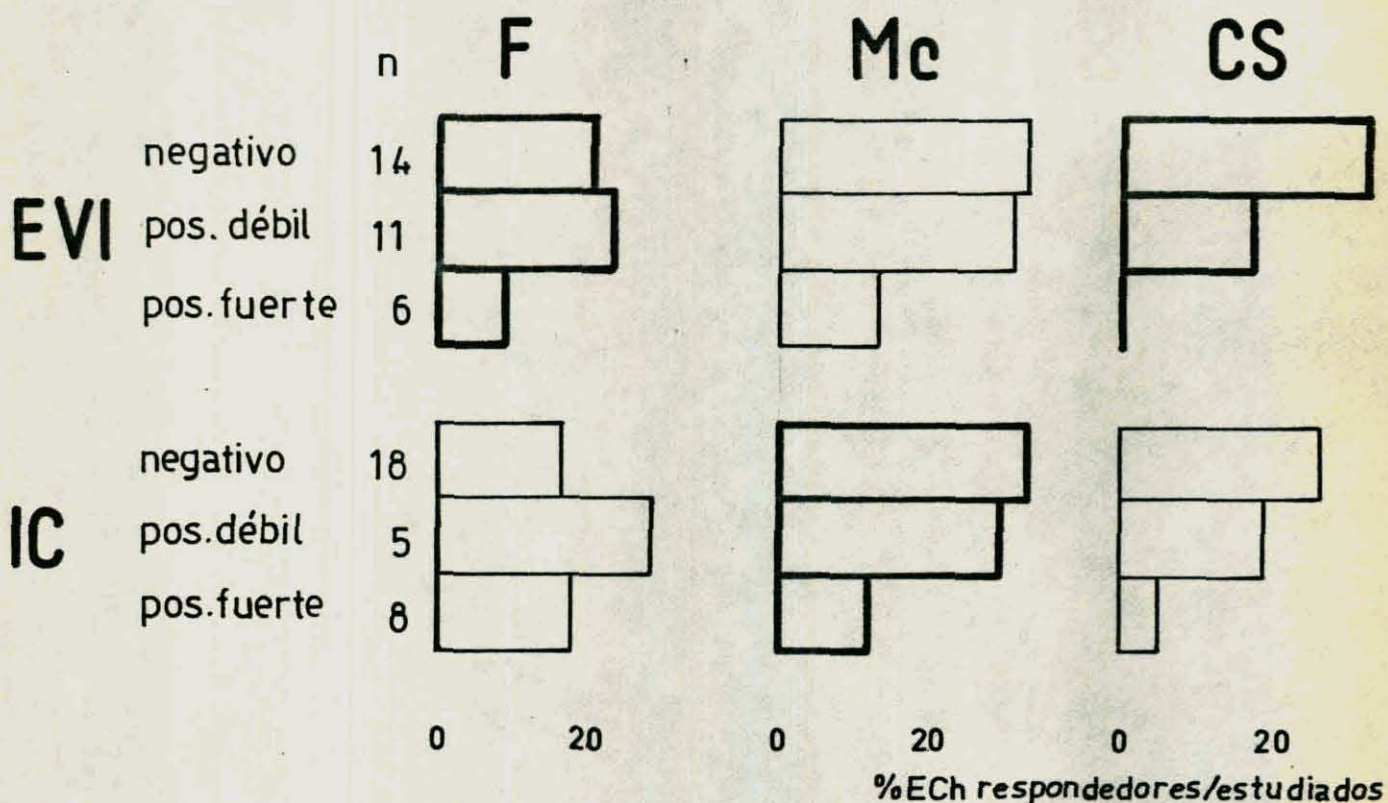
d:  $p < 0,01$

e: estudio de correlación, ELISA =  $0.44 + 0.03 \ln IC$ ,  
 $p < 0,01$



Figura 16

REACCION LINFOPROLIFERATIVA ANTI-*T. CRUZI* EN RELACION  
CON LA ACTIVIDAD HUMORAL ANTI-MIOCARDIO EN 31  
ENFERMOS CHAGASICOS CRONICOS



Se presenta el % de ECh respondedores/estudiados en ensayos de linfoproliferación ante distintas fracciones subcelulares de *T. cruzi* (F, Mc y CS) de 31 ECh agrupados según su reactividad humoral (negativa, positiva débil y positiva fuerte) ante miocardio alogeneico.

Análisis estadístico: (a) correlación ( $y = a x^b$ ): LPr-F vs. EVI, Ech-1,  $p < 0,05$ ; LPr-Mc vs. IC, Ech y Ech-1,  $p < 0,05$ ; (b) frecuencia de asociación (chi-cuadrado): LPr-Mc vs. IC, Ech-1,  $p < 0,05$ ; LPr-CS vs. EVI, Ech,  $p < 0,05$



## CAPITULO 5

REGULACION DE LA RESPUESTA INMUNE  
EN LA ENFERMEDAD DE CHAGAS



## INTRODUCCION

La Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana es una patología endémica en Centro y Sudamérica. Producida por un protozoo flagelado, el *Trypanosoma cruzi*, esta enfermedad presenta tres formas clínicas: aguda, indeterminada y crónica que, si bien no tienen un cuadro único, tienen presentaciones características.

Dos aspectos centrales en la forma crónica de esta enfermedad han sido desde hace muchos años vinculados con el sistema inmune de los seres humanos infectados: 1) la persistencia de los parásitos en el organismo, coexistiendo con manifestaciones funcionales del sistema inmune, y 2) el desarrollo progresivo de lesiones viscerales, más frecuentemente cardíacas en nuestro país, con aparente independencia de la presencia de parásitos en el sitio de lesión.

La presencia de reacciones inmunes específicas, especialmente humorales y, en menor medida, celulares, en organismos infectados por el *T. cruzi*, ha sido demostrada pero, hasta el presente, no se conoce la relación que puedan tener esos mecanismos con el curso de la enfermedad ni con el perfil antigénico del parásito. Tampoco se conocen los mecanismos regulatorios de la respuesta inmune.

También se han demostrado algunos fenómenos inmunológicos que podrían tener relación con el daño tisular, pero ni su desencadenamiento, ni su mecanismo, ni su vinculación con la presencia del parásito o con la respuesta a él son conocidos.



### SINTESIS DE LA LABOR DESARROLLADA

De acuerdo con las finalidades específicas de este trabajo, enunciadas en la última parte del Capítulo 1, hemos investigado la respuesta inmune en la forma crónica de la Enfermedad de Chagas.

Nuestro primer paso fue desarrollar una técnica para el aislamiento de células inmunocompetentes hábiles para estudiar in vitro fenómenos de inmunidad mediada por células. Para evitar que este aislamiento estuviera contaminado con formas circulantes del parásito, desarrollamos una técnica que aprovecha las diferencias de densidad de tripomastigotes y linfocitos. El empleo de una columna bifásica de Ficoll-Hypaque permite aislar más del 80% de las células mononucleares periféricas humanas libres de parásitos. Estas células demostraron retener una capacidad de respuesta blastomitogénica equivalente a la de linfocitos aislados según las técnicas convencionales.

Investigamos entonces la reactividad in vitro al *T. cruzi*. Para ello, empleamos como antígenos el homogeneizado total y distintas fracciones subcelulares de epimastigotes de cultivo. Demostramos que los distintos antígenos del parásito evocan con distinta especificidad y prevalencia respuestas blastomitogénicas de los linfocitos en cultivo. Esta capacidad de respuesta, indicadora de actividad inmune celular, no se ve afectada en los pacientes tratados con distintas drogas tripanocidas; y vimos que es más demostrable en los pacientes con xenodiagnóstico positivo, es decir, con parásitos circulantes comprobados. Demostramos, además, que el perfil de antígenos hacia los cuales pudo demostrarse reactividad celular, se modifica de acuerdo con el estado clínico de



los pacientes.

La respuesta humoral al *T. cruzi* también fue investigada: pudimos demostrar algunas relaciones entre distintos ensayos utilizados para estudiarla y poner en evidencia que, como en la reactividad celular, el perfil de especificidades antigénicas de los anticuerpos circulantes cambia con el curso de la enfermedad.

El análisis de ambos aspectos, celulares y humorales, de la respuesta inmune al *T. cruzi* en un grupo de pacientes permitió demostrar que las distintas vías están relacionadas: los fenómenos celulares y humorales parecen tener intensidades complementarias, sobre todo en los pacientes asintomáticos. Además, la reactividad celular es modificada sensiblemente por la presencia de factores séricos, lo que apoya la existencia de una interrelación entre ambas.

Desde el punto de vista de los antígenos parasitarios podemos sintetizar los resultados de la siguiente manera:

- 1) todas las fracciones ensayadas (F, Mc y CS) muestran alta especificidad para distinguir enfermos chagásicos de sujetos no infectados. En este sentido, Mc se reveló superior a F y CS, tanto en reactividad celular como humoral;
- 2) además, el contenido de anticuerpos anti-Mc permite distinguir pacientes asintomáticos de cardiópatas, aunque esta relación parece estar más vinculada con la cardiopatía que con la infección chagásica;
- 3) inversamente, la reactividad celular a F y CS, y no a Mc, crece con el desarrollo de manifestaciones patológicas;
- 4) el contenido total de Acs circulantes se reveló correlativo con el contenido de Acs dirigidos contra las



- distintas fracciones del parásito, y
- 5) complementario con la reactividad celular a las distintas fracciones;
  - 6) sin embargo, cuando se relacionaron ambas respuestas frente a las mismas preparaciones antigénicas, esta correspondencia sólo pudo ser demostrada en los pacientes asintomáticos frente a Mc y CS.

La reactividad a tejidos homólogos también fue estudiada en sus manifestaciones celulares y humorales. En ambos casos pudimos demostrar su presencia, generalizada cuando se evaluaron Acs específicos y en una significativa proporción de pacientes cuando se evaluó desde el punto de vista celular. En ninguno de los dos casos la presencia y/o intensidad de la reactividad tuvo relación con el estado clínico, aunque sí encontramos que algunos de los fenómenos deben de estar relacionados entre sí ya que sus intensidades relativas aparecen asociadas en una forma complementaria.

Finalmente, analizamos ambas reactividades, a tejido y a *T. cruzi*, en un grupo de enfermos chagásicos y pudimos demostrar algunas relaciones que permitirían vincularlas. Así, la reactividad humoral a miocardio correlacionó con la reactividad humoral a Mc y las reactividades celulares a Mc y F, en los pacientes asintomáticos, correlacionaron respectivamente con las reactividades humorales a estructuras citoplasmáticas (IC) y de membrana (EVI) de células de miocardio. Más aun, pudimos encontrar una significativa relación entre la reactividad humoral a CS y a miocardio.



### CONCLUSIONES DEL TRABAJO

Hemos estudiado diversos aspectos celulares y humorales de la respuesta inmune en la Enfermedad de Chagas crónica.

La respuesta al *T. cruzi* está presente en prácticamente todos los sujetos infectados y está dirigida contra la amplia gama de antígenos del parásito. Los resultados presentados demuestran que esta respuesta presenta diferencias según el estado clínico de los pacientes; tanto los mecanismos celulares como los humorales están dirigidos con distinta intensidad hacia diversas estructuras antigénicas durante el curso de la enfermedad.

Demostramos, además, que los mecanismos celulares y humorales están vinculados entre sí, por lo menos, de una manera clara en la fase asintomática de la enfermedad.

Hemos investigado también la existencia de reactividad inmune contra tejidos del huésped. Demostramos su presencia tanto por mecanismos celulares como humorales, sin relación aparente con el curso de la enfermedad. Vimos que estos mecanismos son múltiples y que, muy probablemente, no sean absolutamente independientes entre sí.

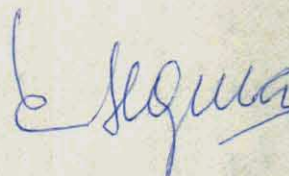
Finalmente, demostramos que los mecanismos inmunes dirigidos contra el parásito y contra los tejidos están vinculados entre sí.

Todo lo señalado permite proponer que existe una diferencia importante de actividad inmune específica entre los pacientes asintomáticos y los pacientes con compromiso orgánico manifiesto; que, evidentemente, en ambas situaciones, la respuesta inmune está regulada, pero que esta regulación operaría en muy distintas condiciones, de manera tal que resultaría insuficiente para eliminar al



parásito del organismo infectado.

La importancia de estas diferencias y su relación con el curso de la enfermedad podrían ser evaluadas tanto por el seguimiento longitudinal de los pacientes como por la investigación clínica de un número importante de pacientes. Estos trabajos deberían también poner en evidencia si alguno de los fenómenos inmunológicos presentados tiene un valor pronóstico para la clínica.





ABREVIATURAS, ACRONIMOS Y DEFINICIONES

Acs	Anticuerpos
Ags	Antígenos
ADCC	Citotoxicidad mediada por Acs
CMC	Citotoxicidad directa
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
C	Sistema complemento
CIC	Complejos inmunes circulantes
CS	Citoplasma soluble de epimastigotes de <i>T.cruzi</i>
ECh	Enfermos chagásicos crónicos
ELISA	Ensayo inmunoenzimático
EVI	Imagen extracelular de Acs reactivos con miocardio
F	Fracción flagelar de epimastigotes de <i>T.cruzi</i>
FH	Ficoll-Hypaque
G	Gammaglobulina
HAI	Hemoaglutinación indirecta
HT	Homogeneizado total de epimastigotes de <i>T.cruzi</i>
HTa	Hipersensibilidad tardía
IC	Imagen intracelular de Acs reactivos con miocardio
IF	Interferón
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
Ig	Inmunoglobulinas(s)
IMC	Inmunidad mediada por células
IML	Inhibición de la migración leucocitaria
LIF	Factor inhibidor de la migración leucocitaria
LPr	Linfoproliferación
Mc	Fracción microsomal de epimastigotes de <i>T.cruzi</i>
MEM	Medio mínimo para cultivo de células
PHA	Fito-hemoaglutinina
RPMI	Medio completo para cultivo de células
XD	Xenodiagnóstico

Autólogo o Singeneico: perteneciente al mismo individuo o cepa

Alogeneico y Homólogo: perteneciente a un individuo de la misma especie, pero genéticamente diferente



### BIBLIOGRAFIA

1. Chagas, C. Nova Trypanosomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n.gen.n.sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homen. Mem.Inst.Oswaldo Cruz, 1: 159-218, 1909.
2. Farrar, J.W.Z., I.G.Kagan, F.O.Everton & T.F.Sellers. Serological evidence of human infection with Trypanosoma cruzi in Georgia. A.J.Hyg., 78: 166-172, 1963.
3. Burkholder, J.E., T.C.Allison & V.P.Kelly. Trypanosoma cruzi (Chagas) (Protozoa: Kinetoplastida) in invertebrate, reservoir and human hosts of the lower Rio Grande Valley of Texas. J.Parasitol., 66: 305-311, 1980.
4. Chagas' disease. Report of a study group. World Health Organization. Tech.Rep.Ser., 202, Geneva, 1969.
5. Segura, E.L., A.C.Pérez. J.Andrade, J.F.Yanovsky & G. J.W.de Martini. Decrease in the prevalence of infection by Trypanosoma cruzi (Chagas' disease) in young men from Argentina. J.Protozool., 30: 164, 1983.
6. Bonet, A.H., J.A.Cichero, E.Kushnir. J.C.Grand & E.L. Segura. Estudio epidemiológico sobre la enfermedad de Chagas Mazza en comunidades rurales de la provincia de Córdoba. La Semana Médica, 133: 581-614, 1968.
7. Wisnivesky, C., A.M.Ruíz & E.L.Segura. Confluence of epidemiological variables on the transmission of Chagas' disease in an endemic area of Argentina. J. Protozool., 30: 164, 1983.
8. Goble, F.C. South American trypanosomiasis. En Immunity in parasitic animals (G.J.Jackson, R.Herman & I.Singer



Eds.) Vol 2, pp 597-686. Academic Press, New York, 1970.

9. Hoare, C.A. The trypanosomes of mammals. A zoological monograph. pp 30-56. Blackwell Scientific Publ., Oxford, Great Britain, 1972.
10. Zeledon, R., N.J.Alvarenga & K.Schosinsky. Ecology of Trypanosoma cruzi. En The insect vector. pp 347. PAHO Scientific Publ., 1977.
11. Cox, F.E.G. Trypanosoma cruzi: signals for transformation. Nature, 300: 685, 1982.
12. Romaña, C. Enfermedad de Chagas. pp 42-44. López Libreros, Ed., Buenos Aires, 1963.
13. Hyde, T.P.& J.A.Dvorak. Trypanosoma cruzi: interaction with vertebrate cells in vitro. II. Quantitative analysis of the penetration phase. Exp.Parasitol., 34: 289-294, 1973.
14. Dvorak, J.A. & C.L.Howe. The attraction of Trypanosoma cruzi to vertebrate cells in vitro. J.Protozool.,23: 534-537, 1976.
15. Dvorak, J.A.& T.P.Hyde. Trypanosoma cruzi: interaction with vertebrate cells in vitro. I. Individual interactions at the cellular and subcellular levels. Exp.Parasitol., 34: 268-283, 1973.
16. Stewart, G.L.& S.Holmes Gianini. Sarcocystis, Trypanosoma, Toxoplasma, Brugia, Ancylostoma and Trichinella spp: a review of the intracellular parasites of striated muscle. Exp.Parasitol., 53: 406-447, 1982.
17. Tanowitz, H.B., C.Brosnan, D.Guastamacchio, G.Baron, C.Raventos Suárez, M.Bornstein & M.Wittner. Infection



of organotypic cultures of spinal cord and dorsal root ganglia with Trypanosoma cruzi. Am.J.Trop.Med. Hyg., 31: 1090-1097, 1982.

18. Bice, D.E. & R.Zeledón. Comparison of infectivity of strains of Trypanosoma cruzi (Chagas 1909). J.Parasitol., 56: 663-670, 1970.
19. Alcántara, A. & Z.Brener. The in vivo interaction of Trypanosoma cruzi bloodstream forms and mouse peritoneal macrophages. Acta Tropica (Basel), 35: 209-219, 1978.
20. González Cappa, S.M., A.M.Katzin, N.Añasco & S. Lajmanovich. Trypanosoma cruzi: comparative studies on infectivity and surface carbohydrates of several strains. Medicina (Buenos Aires), 41: 278-284, 1981.
21. Melo, R.C. & Z.Brener. Tissue tropism of different Trypanosoma cruzi strains. J.Parasitol., 64: 475-482, 1978.
22. Schmuñis, G.A. & A.Szarfman. La enfermedad de Chagas congénito. Medicina (Buenos Aires), 37: 47-53, 1977.
23. Barousse, A.P., M.O.Eposto, S.Mandel & F.Sousa Martínez. Enfermedad de Chagas congénita en área no endémica. Medicina (Buenos Aires), 38: 611-615, 1978.
24. Cerisola, J.A., A.Rabinovich, M.Alvarez, CH.di Corletto & J.Pruneda. Enfermedad de Chagas y la trans-fusión de sangre. Bol.Of.Sanit.Panam., 73: 203-221, 1972.
25. Winne de Martini, G.J., L.Abramo Orrego, A.M.de Rissio, M.Alvarez & L.P.Mujica. Cultivo de Trypanosoma cruzi en un medio monofásico. Su aplicación en cultivos en gran escala en procesos de fermentación.



Medicina (Buenos Aires), 40 (Sup.1): 109-114, 1980.

26. Dusanic, D.G. In vitro production of metacyclic trypomastigotes of Trypanosoma cruzi. J.Parasitol., 66: 1046-1049, 1980.
27. Pan, S.C. Establishment of clones of Trypanosoma cruzi and their characterization in vitro and in vivo. Bull.WHO, 60: 101-107, 1982.
28. Lugones, H.S., O.S.Ledesma, F.A.Peralta, A.E.A.de Marteleur, P.Vozza, Z.Falendys & G.Barbieri. Enfermedad de Chagas. Anales Nestlé, 132: 124-135, 1979.
29. Bocca Tourrés, C. Enfermedad de Chagas. Clínica de fase aguda. En Simposio Internacional sobre Enfermedad de Chagas, pp 227-231. Soc.Argentina de Parasitología, Buenos Aires, 1972.
30. Rassi, A. Clínica: Fase aguda. En Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas (Z.Brener & Z.Andrade, Eds.) pp 249-264. Guanabara Koogan, Rio J., Brasil, 1979.
31. Basso, G., R.Basso & A.Bibiloni. Investigaciones sobre la enfermedad de Chagas-Mazza. EUDEBA, Buenos Aires, 1978.
32. Libonatti, E.& F.Magglio. Manifestaciones neurológicas agudas en la enfermedad de Chagas-Mazza. Rev.Neurol.Arg., 3: 420-424, 1977.
33. Mazza, S. La enfermedad de Chagas en la República Argentina. Mem.Inst.Oswaldo Cruz, 47: 273-288, 1949.
34. Pinto Dias, J.C. Doença de Chagas em Bambui, Minas Gerais, Brasil. Estudo clínico-epidemiológico a partir da fase aguda, entre 1940 e 1982. Tese, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, 1982.



35. Rosembaum, M.B. & J.A.Cerisola. Epidemiología de la enfermedad de Chagas en la República Argentina. Hospital, 60: 75-124, 1961.
36. Rosembaum, M.B. Chagasic myocardiopathy. Prog.Cardio-vasc.Dis., 7: 199-225, 1964.
37. Chiale, P.A., J.Przybylski, R.A.Laino, M.S.Halpern, R.A.Sánchez, A.Gabrieli, M.V.Elizari & M.B.Rosembaum. Electrocardiographic changes evoked by Ajmaline in chronic Chagas' disease without manifest myocarditis. Am.J.Cardiol., 49: 14-20, 1982.
38. González Zuelgaray, J. Electrocardiografía dinámica y computación en el estudio de la miocardiopatía chagásica crónica. En Enfermedad de Chagas (R.A.Posse, G. Mouzo & N.Barrio, Eds.) pp 99-103. Buenos Aires, 1981.
39. Andrade, Z.A., S.G.Andrade, G.B.Oliveira & D.R.Alonso. Histopathology of the conducting tissue of the heart in Chagas' myocarditis. Am.Heart J., 93: 316-324, 1978.
40. Andrade, Z.A.& S.G.Andrade. Anatomía Patológica: cardiopatía chagásica. En Simposio Internacional sobre Enfermedad de Chagas, pp 85-96. Soc.Argentina de Parasitología, Buenos Aires, 1972.
41. Koberle, F. Enteropatías e Enteromegalias. En Simposio Internacional sobre Enfermedad de Chagas, pp 77-84. Soc.Argentina de Parasitología, Buenos Aires, 1972.
42. de Rezende, J.M. Formas digestivas da enfermidade de Chagas. En Simposio Internacional sobre Enfermedad de Chagas, pp 233-243. Soc.Argentina de Parasitología, Buenos Aires, 1972.



43. Koberle, F. Patología y anatomía de la enfermedad de Chagas. Bol.Of.Sanit.Panam., 51: 404-428, 1961.
44. Vieira, C.B., R.V.Godoy & C.F.Carril. Hypersensitivity of the large intestine to cholinergic agents in patients with Chagas' disease and megacolon. Rev. Bras.Gastroent., 16: 41-48, 1964.
45. Vieira, C.B.& R.A.de Godoy. Hiperreatividade da musculatura gástrica à metacolina na moléstia de Chagas crônica. Hospital, 65: 359-363, 1964.
46. Tafuri, W.L.& M.T.de Almeida. Sobre o comportamento do componente vesicular neurosecretor no megaeosôfago da tripanosomiase cruzi humana. Rev.Inst.Med.Trop.São Paulo, 12: 298-309, 1970.
47. Afchain, D. Le caractère antigénique des Trypanosomatidae hetéroxénes parasites de l'homme: Trypanosoma (S) cruzi, Trypanosoma (T.) B.Gambiense et Leishmania donovani. Thèse, Université des Sciences et Techniques de Lille, Francia, 1976.
48. Le Ray, D. Structures antigeniques de Trypanosoma brucei brucei (Protozoa Kinetoplastida): analyse immunoelectrophorétique et étude comparative. Theses Docteur en Sciences, Institut de Zoologie, Faculte de Sciences, Universite Catolique du Lovain, 1974.
49. Borst, P.& G.A.M.Cross. Molecular basis for trypanosome antigenic variation. Cell, 29: 291-303, 1982.
50. Alves, M.J.M.& W.Colli. Agglutination of Trypanosoma cruzi by Concanavalin A. J.Protozool., 21: 575-578, 1974.
51. Gam, A.A.& F.A.Neva. Comparison of cell culture with epimastigote antigens of Trypanosoma cruzi. Am.J.Trop.



Med.Hyg., 26: 47-57, 1977.

52. Kreier, J.P., S.N.Al-Abbassy & T.M.Seed. Trypanosoma cruzi: surface changes characteristics of cultured epimastigotes, trypomastigotes and amastigotes. Rev. Inst.Med.Trop.São Paulo, 19: 10-20, 1977.
53. Katzin, A.M., S.Lajmanovich & S.M.González Cappa. Receptores para lectinas en la superficie de tripomastigotes de Trypanosoma cruzi. Medicina (Buenos Aires, 40: 85-90, 1980.
54. Pereira, M.E., M.A.Loures, F.Villalta & A.F.Andrade. Lectin receptors as markers for Trypanosoma cruzi. Developmental stages and a study of the interaction of wheat germ agglutinin with sialic acid residues on epimastigote cells. J.Exp.Med., 152: 1375-1392, 1980.
55. Araujo, F.G., E.Handman & J.S.Remington. Binding of lectins to the cell surface of Trypanosoma cruzi. J. Protozool., 27: 396-400, 1980.
56. Araujo, F.C.& J.S.Remington. Characterization of stages and strains of Trypanosoma cruzi by analysis of cell membrane components. J.Immunol., 127: 855-858, 1981.
57. Araujo, F.G., S.D.Sharma, V.Tsai, P.Cox & J.S. Remington. Monoclonal antibodies to stages of Trypanosoma cruzi: characterization and use for antigen detection. Infect.Immunity, 37: 344-349, 1982.
58. Nogueira, N., S.Chaplan, J.D.Tydings, J.Unkeless & Z. Cohn. Trypanosoma cruzi: surface antigens of blood and culture forms. J.Exp.Med., 153: 629-639, 1981.



59. Nogueira, N., J.Unkeless & Z.Kohn. Specific glycoprotein antigens on the surface of insect and mammalian stages of Trypanosoma cruzi. Proc.Natl.Acad. Sci., 79: 1259-1263, 1982.
60. Fruit, J., D.Afchain, A.Petitprez & A.Capron. Trypanosoma cruzi: location of a specific antigen on the surface of bloodstream trypomastigote and culture epimastigote forms. Exp.Parasitol., 45: 183-189, 1978.
61. Repka, D., N.Camargo, E.M.Santana, W.M.Cunha, O.C.de Souza, J.K.Sakurada & H.A.Rangel. Surface antigenic determinant of epimastigote forms common to trypomastigote and amastigote forms of different strains of Trypanosoma cruzi. Tropenmed.Parasitol., 31: 239-246, 1980.
62. Okanla, E.O., J.L.Stumpf & D.G.Dusanic. Crossed immunoelectrophoretic analysis of Trypanosoma cruzi epimastigote, metacyclic and bloodstream forms. J.Parasitol., 68: 538-546, 1982.
63. Carniol, C., M.Neves, B.Zingales, P.S.de Araujo & W. Colli. Plasma membrane origin of Trypanosoma cruzi antigenic determinants in Chagas' disease. Rev.Inst. Med.Trop.Sao Paulo, 24: 83-87, 1982.
64. Zingales, B, N.W.Andrews, V.Y.Kuwajima & W.Colli. Cell surface antigens of Trypanosoma cruzi: possible correlation with the interiorization process in mammalian cells. Mol.Biochem.Parasitol., 6: 111-124, 1982.
65. Nussensweig, V., L.M.Deane & J.Kloetzel. Differences in antigenic constitution of strains of Trypanosoma cruzi. Exp.Parasitol., 14: 221-232, 1963.



66. González Cappa, S.M. & I.G.Kagan. Agar gel and immunoelectrophoresis analysis of several strains of Trypanosoma cruzi. Exp.Parasitol., 25: 50-57, 1969.
67. Ketteridge, D. Differentiation of newly isolated strains of Trypanosoma cruzi agglutination and precipitation reactivations. Acta Tropica (Basel), 32: 173-189, 1975.
68. Segura, E.L., E.N.Cura, I.Paulone, C.Vázquez & J.A. Cerisola. Antigenic make-up of subcellular fractions of Trypanosoma cruzi. J.Protozool., 21: 571-574, 1974.
69. Segura, E.L., J.M.Campos, A.Bronzina & J.A.Cerisola. Antígenos de las fracciones subcelulares de Trypanosoma cruzi. I. Localización de antígenos y proteínas en las fracciones subcelulares. Medicina (Buenos Aires, 35: 451-459, 1975.
70. Gottlieb, M. Trypanosoma cruzi: identification of a cell surface polysaccharide. Exp.Parasitol., 45: 200-207, 1978.
71. Araujo, F.G., E.Chiari & J.C.Dias. Demonstration of Trypanosoma cruzi antigen in serum from patients with Chagas' disease. The Lancet, 31: 246-249, 1981.
72. Marcipar, A., S.Barnes, E.Lentwojt & G.Broun. Immuno-enzymatic determination of antibody-bound soluble antigens of Trypanosoma cruzi. App.Biochem.Biotech., 7: 459-462, 1982.
73. Schmuñis, G.A., A.Szarfman, T.Lagenbach & W.de Souza. Induction of capping in blood stage trypomastigotes of Trypanosoma cruzi by human anti-T.cruzi antibodies. Infect.Immun., 20: 567-569, 1978.



74. Leon, W., F.Villalta, T.Queiroz & A.Szarfman. Antibody-induced capping of the intracellular stage of Trypanosoma cruzi. *Infec.Immun.*, 26: 1216-1220, 1979.
75. Schmuñis, G.A., A.Szarfman, W.de Souza & T.Lagenbach. Trypanosoma cruzi: antibody-induced mobility of surface antigens. *Exp.Parasitol.*, 50: 90-102, 1980.
76. González Cappa, S.M., J.Kloetzel, A.M.Katzin & R. Ribeiro Dos Santos. Trypanosoma cruzi: activity of immune sera on surface antigens. *Rev.Inst.Med.Trop.São Paulo*, 22: 275-280, 1980.
78. Bronzina, A., R.Ribeiro Dos Santos, J.O.Márquez, J.A. Cerisola & E.L.Segura. Afinidad de los antígenos de Trypanosoma cruzi por los tejidos de rata. *Rev.Neurol. Arg.*, 3: 483, 1977.
79. Abrahamson, I.A. & J.K.Kloetzel. Presence of Trypanosoma cruzi antigen on the surface of both infected and uninfected cells in tissue culture. *Parasitology*, 80: 147-152, 1980.
80. Ribeiro Dos Santos, R. & L.Hudson. Trypanosoma cruzi: binding of parasite antigens to mammalian cell membranes. *Parasite Immunol.*, 2: 1-10, 1980.
81. Ribeiro Dos Santos, R. & L.Hudson. Trypanosoma cruzi immunological consequences of parasite modification of host cell. *Clin.Exp.Immunol.*, 40: 36-41, 1980.
82. Cossio, P.M., C.Diez, A.Szarfman, E.Kreutzer, B. Candiolo & R.M.Arana. Chagasic cardiopathy: demonstration of a serum gammaglobulin factor which reacts with endocardium and vascular structures. *Circulation*, 49: 13-21, 1974.



83. Taliaferro, W.H. & T. Pizzi. Connective tissue reactions in normal and immunized mice to a reticulotropic strain of Trypanosoma cruzi. J.Infect.Dis., 96: 199-226, 1955.
84. Milder, R.V., J.K.Kloetzel & M.P.Deane. Observation of the interaction of peritoneal macrophages with Trypanosoma cruzi. I. Initial phase of the relationship with bloodstream and culture forms in vitro. Rev.Inst. Med.Trop.São Paulo, 15: 386-392, 1973.
85. Nogueira, N. & Z.Cohn. Trypanosoma cruzi: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. J.Exp.Med., 143: 1402-1420, 1976.
86. Milder, R.V. & J.K.Kloetzel. The development of Trypanosoma cruzi in macrophages in vitro. Interaction with lysosomes and host cell fate. Parasitology, 80: 139-146, 1980.
87. Almeida, M.T.de, A.Alcántara & Z.Brener. Ultrastructural studies of the in vitro interaction of Trypanosoma cruzi bloodstream forms and mouse peritoneal macrophages. Acta Tropica (Basel), 39: 99-109, 1982.
88. Kipnis, T.L., V.L.G.Calich & W.Diaz da Silva. Active entry of bloodstream forms of Trypanosoma cruzi into macrophages. Parasitology, 78: 89-98, 1979.
89. Tanowitz, H., M.Wittner, Y.Kress & B.R.Bloom. Studies of in vitro infection by Trypanosoma cruzi. Ultrastructural studies on the invasion of macrophages and L-cells. Am.J.Trop.Med.Hyg., 24: 25-33, 1975.
90. Meirelles, M.N.L.de, J.T.C.de Araujo Jorge & W.de Souza. Interaction of epimastigote and trypomastigote



forms of Trypanosoma cruzi with chicken macrophages in vitro. Parasitology, 81: 373-381, 1980.

91. Meirelles, M.N.L.de, J.T.C.de Araujo Jorge & W.de Souza. Interaction of Trypanosoma cruzi with macrophages in vitro: dissociation of the attachment and internalization phases by low temperature and Cytochalasin B. Z.Parasitenk., 68: 7-14, 1982.
92. Meirelles, M.N.L.de, E.Chiari & W.de Souza. Interaction of bloodstream, tissue culture-derived and anoxic culture-derived trypomastigotes of Trypanosoma cruzi with macrophages. Acta Tropica (Basel), 39: 195-203, 1982.
93. Villalta, F., L.M.Oda, J.Angluster, C.S.Alviano & W. Leon. Phagocytosis of the three developmental forms of Trypanosoma cruzi: effect of specific sera. Acta Tropica (Basel), 38: 375-382, 1981.
94. Zenian, A. & F.Kierszenbaum. Inhibition of macrophage-Trypanosoma cruzi interaction by Concanavalin A and differential binding of bloodstream and culture forms to the macrophage surface. J.Parasitol., 68: 408-415, 1982.
95. Alcántara, A. & Z.Brener. The in vitro interaction of Trypanosoma cruzi bloodstream forms and mouse peritoneal macrophages. Acta Tropica (Basel), 35: 209-219, 1978.
96. Nogueira, N., S.Chaplan & Z.Cohn. Trypanosoma cruzi: factors modifying ingestion and fate of blood form trypomastigotes. J.Exp.Med., 152: 447-451, 1980.
97. González Cappa, S.M., A.M.Katzin, N.Añasco & S.



- Lajmanovich. Trypanosoma cruzi: comparative studies on infectivity and surface carbohydrates of several strains. Medicina (Buenos Aires), 41: 278-284, 1981.
98. Lima, M.F. & F.Kierszenbaum. Biochemical requirements for intracellular invasion by Trypanosoma cruzi: protein synthesis. J. Protozool., 29: 566-570, 1982.
99. Dvorak, J.A. & G.A.Schmunis. The influence of acute and chronic human chagasic sera on the ability of Trypanosoma cruzi to attach to and penetrate human diploid fibroblasts. Proc. 4th Int. Cong. Parasitol., 26, 1978.
100. Scott, M.T. & L.Moyes. <sup>75</sup>Se-methionine labelled Trypanosoma cruzi blood trypomastigotes: opsonization by chronic infection serum facilitates killing in spleen and liver. Clin. Exp. Immunol., 48: 754-757, 1982.
101. Alcántara, A. & Z.Brener. Trypanosoma cruzi: role of macrophage membrane components in the phagocytosis of bloodstream forms. Exp. Parasitol., 50: 1-6, 1980.
102. Nogueira, N., S.J.Klebanoff & Z.A.Cohn. Trypanosoma cruzi: sensitization to macrophage killing by eosinophil peroxidase. J. Immunol., 128: 1705-1708, 1982.
103. Wirth, J.J. & F.Kierszenbaum. Inhibitory action of elevated levels of adenosine-3'5' cyclic monophosphate on phagocytosis: effects on macrophage - Trypanosoma cruzi interaction. J. Immunol., 129: 2759-2762, 1982.
104. Tafuri, W.L. Patogênese da enfermidade de Chagas. Estudo ao microscopio electronico. En Simposio Internacional sobre enfermedad de Chagas, pp 69-75. Soc. Argentina de Parasitología, Buenos Aires, 1972.



105. Mehlhorn, H., A.Haberkorn & W.Peters. Electron microscopic studies on developmental stages of Trypanosoma cruzi and their surface coat within the heart and skeletal muscle of experimentally infected mice. *Protistológica*, 13: 287-298, 1977.
106. Nogueira, N., S.Chaplan, M.Reesink, J.Tydings & Z.A.Cohn. Trypanosoma cruzi: induction of microbicidal activity in human mononuclear phagocytes. *J.Immunol.*, 128: 2142-2146, 1982.
107. Braun, M., M.L.Satz & E.H.de Titto. Inmunogenética. En *Inmunología e Inmunoquímica* (R.A.Margni, Ed.) pp 148-172. Ed.Panamericana, Buenos Aires, 1982.
108. Nogueira, N.& Z.A.Cohn. Trypanosoma cruzi: uptake and intracellular fate in normal and activated cells. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, 26: 194-203, 1977.
109. Reed, S.G., T.G.Douglas & C.A.Speer. Surface interactions between macrophages and Trypanosoma cruzi. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, 31: 723-729, 1982.
110. Ortiz-Ortiz, L., A.González Mendoza & E.Lamoyi. A vaccination procedure against Trypanosoma cruzi infection in mice by nonspecific immunization. *J.Immunol.*, 114: 1424-1425, 1975.
111. Abrahamson, A., M.Heloisa, S.L.Blotta & M.A.Curotto. Enhancement of delayed-type hypersensitivity to Trypanosoma cruzi in mice treated with *Mycobacterium bovis* BCG and cyclophosphamide. *Infect.Immun.*, 31: 1145-1151, 1981.
112. Araujo, F.G. & E.Nascimento. Trypanosoma cruzi: infection in mice chronically infected with Toxoplasma gondii. *J.Parasitol.*, 63: 1120-1121, 1977.



113. Williams, D.M., S.Sawyer & J.S.Remington. Role of activated macrophages in resistance of mice to infection with Trypanosoma cruzi. J.Infect.Dis., 134: 610-614, 1976.
114. Nogueira, N.& Z.A.Cohn. Trypanosoma cruzi: in vitro induction of macrophage microbicidal activity. J. Exp.Med., 148: 288-300, 1978.
115. Williams, D.M. & J.S.Remington. Effect of human monocytes and macrophages on Trypanosoma cruzi. Immunology, 32: 19-23, 1977.
116. Alves, M.J.M.& M.Rabinovitch. Destruction of intracellular Trypanosoma cruzi after treatment of infected macrophages with cationic electron carriers. Infect.Immun., 39: 435-438, 1983.
117. Goble, F.C. & J.L.Boyd. Reticulo-endothelial blockade in experimental Chagas' disease. J.Parasitol., 48: 223-228, 1962.
118. Kierszenbaum, F, E.Knecht, D.B.Budzko & M.C.Pizzimenti. Phagocytosis: a defense mechanism against infection with Trypanosoma cruzi. J.Immunol., 112: 1839-1844, 1974.
119. Nogueira, N., J.Ellis, S.Chaplan & Z.A.Cohn. Trypanosoma cruzi: in vivo and in vitro correlation between T-cell activation and susceptibility in inbred strains of mice. Exp.Parasitol., 51: 325-334, 1981.
120. Vattuone, I.J.H., A.Szarfman & S.M.González Cappa. Antibody response and immunoglobulin levels in humans



with acute or chronic Trypanosoma cruzi infections (Chagas' disease). J.Trop.Med.Hyg., 76: 45-47, 1973.

121. Schmuñis, G.A., A.Szarfman, L.Coarasa & C.Vainstočk. Immunoglobulin concentration in treated human acute Chagas' disease. A follow-up study. Am.J.Trop.Med. Hyg., 27: 473-477, 1978.
122. Schmuñis, G.A., A.Szarfman, L.Coarasa, C.Guillerón & J.M.Peralta. Anti-Trypanosoma cruzi agglutinins in acute human Chagas' disease. Am.J.Trop.Med.Hyg., 29: 170-178, 1980.
123. Lelchuk, R., A.Dalmasso, C.I.Inglesini, M.Alvarez & J.A.Cerisola. Immunoglobulin studies in serum of patients with American Trypanosomiasis. Clin.Exp. Immunol., 6: 547-555, 1970.
124. Pinto, C. & P.Falcao. Eletroforeses na doença de Chagas. Rev.Bras.Med., 15: 536-539, 1958.
125. Hanson, W.L., R.F.Devlin & E.L.Roberson. Immunoglobulin levels in a laboratory-acquired case of human Chagas' disease. J.Parasitol., 60: 532-533, 1974.
126. Kortsarz, F., Strizic, N.A. & E.B.Castillo. Electroforesis de las proteínas séricas en la miocarditis crónica chagásica. Medicina (Buenos Aires), 25: 299-305, 1965.
127. Marsden, P.D., S.K.K.Seah, K.E.Mott, A.Prata & H. Platt. Immunoglobulins in Chagas' disease. J.Trop. Med.Hyg., 73: 157-161, 1970.
128. Martín, U., D.Afchain & A.Capron. Immunoglobulin E and Chagas' disease. J.Protozool., en prensa.



129. Dagusmao, R., J.M.Rezende, A.Rassi, A.A.Gam & F.A. Neva. Antibody levels to Trypanosoma cruzi in infected patients with and without evidence of chronic Chagas' disease. Am.J.Trop.Med.Hyg., 31: 452-458, 1982.
130. Cerisola, J.A., M.Alvarez & A.M.De Rissio. Inmuno-diagnóstico da doença de Chagas. Evolução serológica de pacientes con doença de Chagas. Rev.Inst.Med.Trop. São Paulo, 12: 403-411, 1970.
131. Ferraz de Siqueira, A., R.Domínguez Ribeiro & F. Ferrioli filho. Early immunological aspects in rats infected by Trypanosoma cruzi. I. Agglutination and immunofluorescence tests with antigens of trypomas-tigotes recovered in successive days of the infection. Rev.bras.Pesq.Med.e Biol., 11: 35-37, 1978.
132. Peralta, J.M., L.Filardi, M.A.L.Loures & S.T.Torres. Trypanosoma cruzi antibodies in mice infected with different strains of Trypanosoma cruzi. J.Parasitol., 66: 342-344, 1980.
133. Muniz, J.& G.Freitas. Contribuição para o diagnóstico da doença de Chagas pelas reações de imunidade. I. Estudo comparativo entre as reações de aglutinação e de fixação do complemento. Mem.Inst.Oswaldo Cruz, 41: 303-333, 1944.
134. Muniz, J.& G.Freitas. Contribuição para o diagnóstico da doença de Chagas pelas reações de imunidade. II. Isolamiento de polissacarídeos de Schizotrypanum cruzi e de outros tripanosomatídeos, seu comportamento nas reações de precipitação, de fixação de complemento e de hipersensibilidade. Os "tests" de floculação (su-



blimado e formol-gel). Rev.bras.Biol., 4: 421-438, 1944.

135. Kierszenbaum, F. Cross-reactivity of Lytic antibodies against blood forms of Trypanosoma cruzi. J.Parasitol., 62: 134-135, 1976.
136. Krettli, A.U., P.Weisz-Carrington & R.S.Nussensweig. Membrane-bound antibodies to bloodstream Trypanosoma cruzi in mice: strain differences in susceptibility to complement-mediated lysis. Clin.Exp.Immunol., 37: 416-423, 1979.
137. Krettli, A.U. & Z.Brener. Resistance against Trypanosoma cruzi associated to anti-living trypomastigote antibodies. J.Immunol., 128: 2009-2012, 1982.
138. Krettli, A.U., J.R.Cançado & Z.Brener. Effect of specific chemotherapy on the levels of Lytic antibodies in Chagas' disease. Trans.Roy.Soc.Trop.Med.Hyg., 76: 334-340, 1982.
139. Krettli, A.U., N.Thomas & H.Eisen. Escape mechanisms of Trypanosoma cruzi from the host immune system. En Les Colloques de l'INSERM: Cancer Immunology and Parasite Immunology (L.Israël, P.Lagrange & J.C.Salomon, Eds.) Vol 97, pp 553-558, 1980.
140. Powell, M.R. & R.E.Kuhn. Measurement of cytolytic antibody in experimental Chagas' disease using a terminal radio labelling procedure. J.Parasitol., 66: 399-406, 1980.
141. González Cappa, S.M., A.M.Katzin & S.Lajmanovich. Trypanosoma cruzi: actividad de inmunosueros de ratón sobre el estadio tripomastigote. Medicina (Buenos Aires), 39: 187-192, 1979.



142. Sánchez, D.O. & S.M. González Cappa. Neutralizing antibodies in Trypanosoma cruzi infection. Medicina (Buenos Aires), 43: 41-46, 1983.
143. Kierszenbaum, F. & M.M. Hayes. Mechanisms of resistance against experimental Trypanosoma cruzi infection. Requirements for cellular destruction of circulating forms of Trypanosoma cruzi in human and murine in vitro systems. Immunology, 40: 61-66, 1980.
144. Kuhn, R.E. & G.W. Cassida. Cytophilic antibody in experimental Chagas' disease. J. Parasitol., 67: 807-812, 1981.
145. Hajos, S.E., C.H. Carbonetto, R.A. Margni, M. Esteva & E.L. Segura. Purification and properties of anti-Trypanosoma cruzi antibodies isolated from patients with chronic Chagas' disease. Immunol. Lett., 4: 199-204, 1982.
146. Kierszenbaum, F. Protection of congenitally athymic mice against Trypanosoma cruzi infection by passive antibody transfer. J. Parasitol., 66: 673-675, 1980.
147. Culberston, J.T. & M.H. Kolodny. Acquired immunity in rats against Trypanosoma cruzi. J. Parasitol., 24: 83-90, 1938.
148. Kagan, I.G. & L. Norman. Immunologic studies on Trypanosoma cruzi. IV. Serial transfer of organisms from immune to nonimmune mice. J. Parasitol., 48: 584-588, 1962.
149. Ryckman, R.E. Epizootiology of Trypanosoma cruzi in south-western North America. VII. Experimental control of Trypanosoma cruzi by immunological methods. J. Med.



Entom., 2: 105-108, 1965.

150. Krettli, A.U. & Z. Brener. Protective effects of specific antibodies in Trypanosoma cruzi infection. J. Immunol., 116: 755-760, 1976.
151. Mc Hardy, N. Immunization of mice against Trypanosoma cruzi. The effect of size of dose, and route of infection, of immunizing and challenge inocula. Tropenmed. Parasitol., 28: 11-16, 1977.
152. Mc Hardy, N. Passive immunization of mice against Trypanosoma cruzi using convalescent mouse serum. Tropenmed. Parasitol., 28: 195-201, 1977.
153. Mc Hardy, N. Passive protection of mice against infection with Trypanosoma cruzi with plasma: the use of blood- and vector bug-derived trypomastigote challenge. Parasitology, 80: 471-480, 1980.
154. Takehara, H.A., A. Perini, M.H. da Silva & I. Mota. Trypanosoma cruzi: role of different antibody classes in protection against infection in the mouse. Exp. Parasitol., 52: 137-146, 1981.
155. Dias, E. Estudos sobre o Schizotrypanum cruzi. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 28: 1-110, 1934.
156. Hauschka, T.S., M.B. Goodwin, J. Palmquist & E. Brown. Immunological relationship between seven strains of Trypanosoma cruzi and its application in the diagnosis of Chagas' disease. Am. J. Trop. Med. Hyg., 30: 1-16, 1950.
157. Voller, A. & J.J. Shaw. Immunological observations on an antiserum to Trypanosoma cruzi. Z. Tropenmed. Parasitol., 48: 180-187, 1965.



158. Hanson, W.L. Immunology of American Trypanosomiasis (Chagas' disease). En Immunology of Parasitic Infections (S.Cohen & E.Sadun, Eds.) Ch 17, pp 222-234. Blackwell Scient.Publ., Oxford, Great Britain, 1976.
159. Kierszenbaum, F. & J.G.Howard. Mechanisms of resistance against experimental Trypanosoma cruzi infection: the importance of antibodies and antibody-forming capacity in the Biozzi high and low responder mice. J.Immunol., 116: 1208-1211, 1976.
160. Corsini, A.C., R.Braz, D.B.Ciampi & M.R.L.Zucato. Resistance to Trypanosoma cruzi: infection in relation to the timing of IgG humoral response. Z.Parasitenk, 68: 15-25, 1982.
161. Rodríguez, A.M., F.Santoro, D.Afchain, H.Bazin & A. Capron. Trypanosoma cruzi infection in B-cell-deficient rats. Infect.Immun. , 31: 524-529, 1981.
162. Anziano, D.F., A.P.Dalmasso, R.Lelchuk & C.Vasquez. Role of complement in immune Lysis of Trypanosoma cruzi. Infect.Immun., 6: 860-864, 1972.
163. Goldstein, I.M. & G.Weissman. Non-phagocytic stimulation of human polymorphonuclear leukocytes: role of the plasma membrane. Sem.Hematol., 16: 175-187, 1979.
164. Dias, E. Soc.Biol.Paris , CXII: 1474-1475, 1933.
165. Nery-Guimaraes, F., I.Venâncio & N.Grynberg. Refratariedade da galinhas ao Trypanosoma cruzi. III. Dissociação dos fenômenos da refratariedade e da lise dos epimastigotas pelo soro das aves. Mem.Inst. Oswaldo Cruz, 72: 131-136, 1974.



166. Kierszenbaum, F., J.Ivanyi & D.B.Budzko. Mechanisms of natural resistance to trypanosomal infection: role of complement in avian resistance to Trypanosoma cruzi infection. Immunology, 30: 1-6, 1976.
167. Kierszenbaum, F, C.A.Gottlieb & D.B.Budzko. Antibody-independent, natural resistance of birds to Trypanosoma cruzi infection. J.Parasitol., 67: 656-660, 1981.
168. Minter-Goedbloed, E.& J.J.A.B.Croon. The insusceptibility of chickens to Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi. Trans.Roy.Soc.Trop.Med.Hyg., 75: 350-353, 1981.
169. Budzko, D.B., M.C.Pizzimenti & F.Kierszenbaum. Effect of complement depletion in experimental Chagas' disease: immune lysis of virulent blood forms of Trypanosoma cruzi. Infect.Immun., 11: 86-91, 1975.
170. Dalmaso, A.P.& J.E.Jarvinen. Experimental Chagas' disease in complement-deficient mice and guinea pigs. Infect.Immun., 28: 434-440, 1980.
171. Cunningham, D.S., W.H.Craig & R.E.Kuhn. Reduction of complement levels in mice infected with Trypanosoma cruzi. J.Parasitol., 64: 1044-1049, 1978.
172. Cunningham, D.S., T.E.Brewer, R.E.Kuhn & W.H.Craig. Partial characterization of Trypanosoma cruzi-released decomplementing factor. J.Parasitol., 67: 475-480, 1981.
173. Scharfstein, J., M.A.Barcinski & L.L.Leon. Induction of the Acute-Phase Protein Serum Amyloid P in experimental Chagas' disease. Infec.Immun., 35: 46-51, 1982.
174. Riera, N.E., A.Malbrán, V.Ritacco, P.M.Cossio, R.M.



Arana & M.M.de E.de Bracco. El sistema complemento en la enfermedad de Chagas crónica. Medicina (Buenos Aires), 40: 125-132, 1980.

175. Dzebenski, T.H. Exoantigen of Trypanosoma cruzi in vivo. Tropenmed.Parasitol., 25: 485-491, 1974.
176. Araujo, F.G. Immunology of Chagas' disease. I. Circulating antigens in mice experimentally infected with Trypanosoma cruzi. Rev.Inst.Med.Trop.São Paulo, 18: 433-439, 1976.
- 176 bis. Gottlieb, M. A carbohydrate-containing antigen from Trypanosoma cruzi and its detection in the circulation of infected mice. J.Immunol., 119: 465-470, 1977.
177. Chaves, J., R.G.Ferri, T.A.Kliemann, I.Irulegui & H.B.de Souza. Complexos imunes circulantes na doença de Chagas experimental. Identificação de antígenos parasitarios nos complexos. Rev.Inst.Med.Trop.São Paulo, 21: 77-81, 1979.
178. Laguens, R.P., P.M.Cossio, C.Diez, A.Segal, C.Vasquez, E.Kreutzer, E.Khoury & R.M.Arana. Immunopathologic and morphologic studies of skeletal muscle in Chagas' disease. Am.J.Pathol., 80: 153-162, 1975.
179. Chaves, J., O.N.Mariano, H.B.W.T.de Souza, I.Irulegui & C.A.Coppi. Deposição de complexos imunes na doença de Chagas experimental. Rev.Inst.Med.Trop.São Paulo, 24: 11-15, 1982.
180. Huang, K-Y, W.W.Schultz & F.B.Gordon. Interferon induced by Plasmodium berghei. Science, 162: 123-124, 1968.



181. Rytel, M.W. & T.C. Jones. Induction of interferon in mice with Toxoplasma gondii. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 123: 859-862, 1966.
182. Freshman, M.M., T.C. Merigan, J.S. Remington & I.E. Brownlee. In vitro and in vivo antiviral action of an interferon-like substance induced by Toxoplasma gondii. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 123: 862-866, 1966.
183. Rytel, M.W. & P.D. Marsden. Induction of an interferon-like inhibitor by Trypanosoma cruzi infection in mice. Am. J. Trop. Med. Hyg., 19: 929-931, 1970.
184. Schmuñis, G.A., S. Baron, S.M. González Cappa & M. Weissenbacher. El Trypanosoma cruzi como inductor de interferón. Medicina (Buenos Aires), 37: 429-430, 1977.
185. Sonnenfeld, G. & F. Kierszenbaum. Increased serum levels of an interferon-like activity during the acute period of experimental infection with different strains of Trypanosoma cruzi. Am. J. Trop. Med. Hyg., 30: 1189-1191, 1981.
186. Kierszenbaum, F. & G. Sonnenfeld. Characterization of the antiviral activity produced during Trypanosoma cruzi infection and protective effects of exogenous interferon against experimental Chagas' disease. J. Parasitol., 68: 194-198, 1982.
187. James, S.L., T.L. Kipnis, A. Sher & R. Hoff. Enhanced resistance to acute infection with Trypanosoma cruzi in mice treated with an interferon inducer. Infect. Immun., 35: 588-593, 1982.
188. Martinez-Silva, R., V.A. López & J. Chiriboga. Effects



of Poly I-C on the course of infection with Trypanosoma cruzi. Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 134: 885-888, 1970.

189. Romaña, C. Acerca de un síntoma inicial de valor para el diagnóstico de forma aguda de la enfermedad de Chagas. La conjuntivitis esquizotripanósica unilateral (hipótesis sobre puerta de entrada conjuntival de la enfermedad) Public.MEPRA, 22: 16-28, 1935.
190. Mazza, S., G.Basso, R.Basso, R.S.Freire, J.C.Herrera, M.E.Jorg & S.Miyara. Esquizotripánides: manifestaciones eruptivas agudas en la enfermedad de Chagas (exantemas o roseolas). Public.MEPRA, 51: 3-74, 1941.
191. Amato Neto, V., C.Magaldi & S.Pessoa. Rev.Goiana Med., 10: 121-126, 1964.
192. Tschudi, E.I., D.F.Anziano & A.P.Dalmasso. Blast cell transformation with Trypanosoma cruzi. Infect.Immun., 6: 905-908, 1972.
193. Brener, Z. O Parasito: Relações Hospedeiro-parasito. En Trypanosoma cruzi e doença de Chagas (Z.Brener & Z.Andrade, Eds.) pp 1-41. Guanabara Koogan, Rio J., Brasil, 1979.
194. Patrucco, A., J.A.Cerisola, M.Michel, P.Chiale, M. Alvarez & E.L.Segura. Flagellar antigens and the leukocyte migration-inhibition test in Chagas' patients. Trans.Roy.Soc.Trop.Med.Hyg., 72: 425-426, 1978.
195. González Cappa, S.M., G.A.Schmuñis, O.C.Traversa, J. F.Yanovsky & A.S.Parodi. Complement-fixation tests and experimental immunization with antigens of Trypanosoma cruzi prepared under pressure. Am.J.Trop. Med.Hyg., 17: 709-715, 1968.



196. Teixeira, A.R.L. & C. Santos Buch. The immunology of experimental Chagas' disease. II. Delayed hypersensitivity to Trypanosoma cruzi antigens. Immunology, 28: 401-410, 1975.
197. Scott, M.T. Delayed hypersensitivity to Trypanosoma cruzi in mice: specific suppressor cells in chronic infection. Immunology, 44: 409-418, 1981.
198. Lelchuk, R., A. Patrucco & J. Manni. Studies of cellular immunity in Chagas' disease: effect of glutaraldehyde-treated specific antigen on inhibition of leukocyte migration. J. Immunol., 112: 1578-1581, 1974.
199. Lelchuk, R., R.L. Cardoni & A.S. Fuks. Cell-mediated immunity in Chagas' disease. Alterations induced by treatment with a trypanocidal drug (Nifurtimox). Clin. Exp. Immunol., 30: 434-438, 1977.
200. Toledo Barros, M.A., V. Amado Neto, E. Mendes & I. Mota. In vitro cellular immunity in Chagas' disease. Clin. Exp. Immunol., 38: 376-380, 1979.
201. Seah, S. Delayed hypersensitivity in Trypanosoma cruzi infection. Nature, 225: 1256-1257, 1970.
202. Schmuñis, G.A., H. Vattuone, A. Szarfman & U.J. Pesce. Cell-mediated immunity in mice inoculated with epimastigotes or trypomastigotes of Trypanosoma cruzi. Tropenmed. Parasitol., 24: 81-85, 1973.
203. Vattuone, N.H., S.M. González Cappa, S. Menes & G.A. Schmuñis. Cell-mediated and humoral immune response of mice infected with Trypanosoma cruzi. Tropenmed. Parasitol., 25: 267-272, 1974.



204. Mosca, W., J.Plaja, E.Gallardo & H.García Barrios. Immune response in human Chagas' disease. I. Lymphocyte blastogenesis in chagasic patients without evidence of cardiomyopathy. Acta Cient.Venezolana, 30: 401-404, 1979.
205. Mosca, W.& J.Plaja. Immune response in human Chagas' disease. II. Lymphocyte blastogenesis in patients with chagasic cardiomyopathy. Acta Cient.Venezolana, 31: 464-467, 1980.
206. Kierszenbaum, F. On evasion of Trypanosoma cruzi from the host immune response. Lymphoproliferative responses to trypanosomal antigens during acute and chronic Chagas' disease. Immunology, 44: 641-648, 1981.
207. Teixeira, A.R.L. & C.Santos Buch. The immunology of experimental Chagas' disease. II. Delayed hypersensitivity to Trypanosoma cruzi antigens. Immunology, 28: 401-410, 1975.
208. Abrahamson, I.A.& W.Dias da Silva. Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity against Trypanosoma cruzi. Parasitology, 75: 317-323, 1977.
209. Sanderson, C.J., A.F.López & M.M.Bunn Moreno. Eosinophils and not lymphoid K-cells kill Trypanosoma cruzi epimastigotes. Nature, 268: 340-341, 1977.
210. Sanderson, C.J., M.M.Bunn Moreno & A.F.López. Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity of Trypanosoma cruzi: the release of tritium labelled RNA, DNA and protein. Parasitology, 76: 299-307, 1978.
211. López, A.F., M.M.Bunn Moreno & S.J.Sanderson. The



- lysis of Trypanosoma cruzi epimastigotes by eosinophils and neutrophils. *Int.J.Parasitol.*, 8: 485-489, 1978.
212. Madeira, E.D., A.F.B.de Andrade, M.M.Bunn Moreno & M.Barcinski. Antibody-dependent cell cytotoxicity of Trypanosoma cruzi: characterization of the effector cell from normal human blood. *Infec.Immun.*, 25: 34-38, 1979.
213. Olabuenaga, S.E., R.L.Cardoni, E.L.Segura, N.E.Riera & M.M.de E.de Bracco. Antibody-dependent cytotoxicity of Trypanosoma cruzi by human polymorphonuclear leukocytes. *Cell.Immunol.*, 45: 85-93, 1979.
214. Kierszenbaum, F. Antibody-dependent killing of bloodstream forms of Trypanosoma cruzi by human peripheral blood leukocytes. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, 28: 965-968, 1979.
215. Okabe, K., T.L.Kipnis, V.L.G.Calich & W.Dias da Silva. Cell-mediated cytotoxicity to Trypanosoma cruzi. I. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity to trypomastigote bloodstream forms. *Clin.Immunol.Immunopathol.*, 16: 344-353, 1980.
216. T.L.Kipnis, S.L.James, A.Sher & J.R.David. Cell-mediated cytotoxicity to Trypanosoma cruzi. II. Antibody-dependent killing of bloodstream forms by mouse eosinophils and neutrophils. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, 30: 47-53, 1981.
217. Rimoldi, M.T., R.L.Cardoni, S.E.Olabuenaga & M.M.de E.de Bracco. Trypanosoma cruzi: sequence of phagocytosis and cytotoxicity by human polymorphonuclear leukocytes. *Immunology*, 42: 521-527, 1981.



218. Olabuenaga, S.E., M.T.Rimoldi, R.L.Cardoni, N.E. Riera, R.A.Sánchez, P.Chiale & M.M.de E.de Bracco. Cytotoxic activity of leukocytes of chronic chagasic patients against Trypanosoma cruzi. Medicina (Buenos Aires), 43: 168-174, 1983.
219. López, A.F., R.Ribeiro Dos Santos & C.L.Sanderson. Antibody-dependent cytotoxicity of Trypanosoma cruzi antigen-coated mouse cell lines by eosinophils and neutrophils. Parasite Immunol., 5: 77-84, 1983.
220. Hatcher, F.M.& R.E.Kuhn. Spontaneous lytic activity against allogeneic tumor cells and depression of specific cytotoxic responses in mice infected with Trypanosoma cruzi. J.Immunol., 126: 2436-2442, 1981.
221. Hatcher, F.M., R.E.Kuhn, M.C.Cerrone & R.C.Burton. Increased NK cell activity in experimental American Trypanosomiasis. J.Immunol., 127: 1126-1130, 1981.
222. Hatcher, F.M.& R.E.Kuhn. Destruction of Trypanosoma cruzi by NK cells. Science, 218: 295-297, 1982.
223. Dleu, J.Y., J.A.Heinbaugh, H.T.Holden & R.B.Herberman. Augmentation of mouse NK cell activity by interferon and interferon inducers. J.Immunol., 122: 175-183, 1979.
224. Eugui, E.M. & A.C.Allison. Differences in susceptibility of various mouse strains to haemoprotozoan infections: possible correlation with NK activity. Parasite Immunol., 2: 277-284, 1980.
225. Schmuñis, G.A., S.M.González Cappa, O.C.Traversa & J.F.Yanovsky. The effect of immuno-depression due to neonatal thymectomy in infections with Trypanosoma



- cruzi in mice. Trans.Roy.Soc.Trop.Med.Hyg., 65: 89-94, 1971.
226. Burgess, D.E. & W.L.Hanson. Trypanosoma cruzi: the T-cell dependence of the primary immune response and the effects of depletion of T-cells and Ig-bearing cells on immunological memory. Cell Immunol., 52: 176-186, 1980.
227. Roberson, E.L., W.L.Hanson & W.L.Chapman, Jr. Trypanosoma cruzi: effects of anti-thymocyte serum in mice and neonatal thymectomy in rats. Exp.Parasitol., 34: 168-180, 1973.
228. Kierszenbaum, F. & M.M.Pienłowski. Thymus-dependent control of host defense mechanisms against Trypanosoma cruzi infection. Infect.Immun., 24: 117-123, 1979.
229. Kierszenbaum, F. Protection of congenitally athymic mice against Trypanosoma cruzi infection by passive antibody transfer. J.Parasitol., 66: 673-675, 1980.
230. Segura, E.L., M.Esteva, C.J.Quintans, L.S.Montoro & M.C.Weissenbacher. Infección con Trypanosoma cruzi en ratones congénitamente atímicos. Medicina (Buenos Aires), 41: 328-332, 1981.
231. Ribeiro Dos Santos, R. Contribuição ao estudo da imunidade na fase aguda da doença de Chagas experimental. Rev.Pat.Trop., 2: 433-459, 1973.
232. Roberson, E.L. & W.L.Hanson. Transfer of immunity to Trypanosoma cruzi. Trans.Roy.Soc.Trop.Med.Hyg., 68: 338, 1974.
233. Burgess, D.E. & W.L.Hanson. Adoptive transfer of protection against Trypanosoma cruzi with lymphocytes



- and macrophages. Infect.Immun., 25: 838-843, 1979.
234. Trischmann, M. & B.R.Bloom. Trypanosoma cruzi: ability of T-cell enriched and -depleted lymphocyte populations to passively protect mice. Exp.Parasitol., 49: 225-232, 1980.
235. Reed, S.G. Adoptive transfer of resistance to acute Trypanosoma cruzi infection with T-lymphocytes-enriched spleen cells. Infect.Immun., 28: 404-410, 1980.
236. Scott, M.T. The nature of immunity against Trypanosoma cruzi in mice recovered from acute infection. Parasite Immunol., 3: 209-218, 1981.
237. Pizzi, T., M.Rubio & Knierim. Inmunología de la enfermedad de Chagas. Bol.Chil.Parasitol., 9: 35-47, 1954.
238. Nery-Guimaraes, F. & H.A.Lage. Ação da betametasona na doença de Chagas experimental. III. Ensaio negativo da inibição dos efeitos agravantes em ratos albinos, pela ministração de células esplênicas de ratos normais. Hospital, 77: 201-209, 1970.
239. González Cappa, S.M. & E.L.Segura. Enfermedad de Chagas. Adel.Microbiol.Enf.Infec., 1: 51-102, 1982.
240. Nery-Guimaraes, F. Ação da betametasona na doença de Chagas experimental. IV. Agravamento de infecções crônicas, e ausência de possíveis infecções congênitas e/ou transmitidas pelo leite, em ratos albinos. Hospital, 79: 3-18, 1971.
241. Kunar, R., I.K.Kline & W.H.Abelmann. Immunosuppression in experimental acute and subacute chagasic myocarditis. Am.J.Trop.Med.Hyg., 19: 932-939, 1970.



242. Hayes, M.M. & F. Kierszenbaum. Experimental Chagas' disease: kinetics of lymphocyte responses and immunological control of the transition from acute to chronic Trypanosoma cruzi infection. *Infect. Immun.*, 31: 1117-1124, 1981.
243. Abrahamson, I.A., M.H.S.L. Blotta & M.A. Curotto. Enhancement of delayed-type hypersensitivity to Trypanosoma cruzi in mice treated with *Mycobacterium bovis* BCG and Cyclophosphamide. *Infect. Immun.*, 31: 1145-1151, 1981.
244. Barousse, A.P., S. C6ppola, J.A. Costa & H. Laplum6. Enfermedad de Chagas e inmunosupresi6n. *Medicina (Buenos Aires)*, 37: 428, 1977.
245. Barousse, A.P., J.A. Costa, M. Eposto, H. Laplum6 & E. L. Segura. Enfermedad de Chagas e inmunodepresi6n. *Medicina (Buenos Aires)*, 40 (Supl.1): 17-26, 1980.
246. Monteverde, D.A., A.L. Taratuto & N. Lucatelli. Meningoencefalitis chag6sica aguda en pacientes inmunosuprimidos. *Rev. Neurol. Arg.*, 2: 260-266, 1976.
247. Kohl, S., L.K. Pickering, L.S. Frankel & R.G. Yaeger. Reactivation of Chagas' disease during therapy of acute lymphocytic leukemia. *Cancer*, 50: 827-829, 1982.
248. Manigot, D.A., A. Bastos, M.L. De Souza, R.T. Nakashima & E.D. Carvalhal. Transfusion-induced Chagas during immunodepressive treatment. *Medicina (Buenos Aires)*, 43: 235-236, 1983.
249. Collier, W.A. Uber immunitat der Chagaskrankheit des weissen Maus. *Z. Hyg. Infektionskr.*, 112: 88-95, 1931.



250. Pizzi, T. & R. Prager. Inmunidad a la sobreinfección inducida mediante cultivos de Trypanosoma cruzi de virulencia atenuada. Bol. Infor. Parasit. Chil., 7: 20-29, 1952.
251. Szarfman, A., G.A. Schmuñis, N.H. Vattuone, J.F. Yanovsky, P.M. Cossio & R.M. Arana. Protection against challenge of mice experimentally infected with Trypanosoma cruzi. Tropenmed. Parasitol., 28: 333-341, 1977.
252. Basombrío, M.A. Resistencia a re-infecciones por el Trypanosoma cruzi en ratones chagásicos. Medicina (Buenos Aires), 41 (Supl.): 230-232, 1981.
253. Cabeza Meckert, P. & R.P. Laguens. Chronic Chagas' disease in the mouse. III. Absence of concomitant immunity after repeated infections. Medicina (Buenos Aires), 41: 543-548, 1981.
254. Reed, S.G., C.L. Larson & C.A. Speer. Suppression of cell-mediated immunity in experimental Chagas' disease. Z. Parazitenk., 52: 11-17, 1977.
255. Reed, S.G., C.L. Larson & C.A. Speer. Contact sensitivity responses in mice infected with Trypanosoma cruzi. Infect. Immun., 22: 548-554, 1978.
256. Ramos, C., I. Schadtler-Siwon & L. Ortiz Ortiz. Suppressor cells present in the spleens of Trypanosoma cruzi-infected mice. J. Immunol., 122: 1243-1247, 1979.
257. Rowland, E.C. & R.E. Kuhn. Suppression of anamnestic cellular responses during experimental American Trypanosomiasis. J. Parasitol., 64: 741-742, 1978.
258. Rowland, E.C. & R.E. Kuhn. Suppression of cellular responses in mice during Trypanosoma cruzi infection.



Infect.Immun., 20: 393-397, 1978.

259. Cunningham, D.S. & R.E.Kuhn. Lymphoblast transformation as a measure of immune competence during experimental Chagas' disease. J.Parasitol., 66: 390-398, 1980.
260. Kierszenbaum, F. & M.M.Hayes. Evaluation of lymphocyte responsiveness to polyclonal activators during acute and chronic experimental Trypanosoma cruzi infection. Am.J.Trop.Med.Hyg., 29: 708-710, 1980.
261. Kierszenbaum, F. Immunologic deficiency during experimental Chagas' disease (Trypanosoma cruzi) infection: role of adherent, non-specific esterase-positive splenic cells. J.Immunol., 129: 2202-2205, 1982.
262. Maleckar, J.R. & F.Kierszenbaum. Inhibition of mitogen-induced proliferation of mouse T and B lymphocytes by bloodstream forms of Trypanosoma cruzi. J.Immunol., 130: 908-911, 1983.
263. Curotto, M.A. & I.A.Abrahamson. Contact sensitivity to DNFB in Trypanosoma cruzi-infected mice. Rev.Inst. Med.Trop.Sao Paulo, 24: 69-74, 1982.
264. Ortiz Ortiz, L., T.Ortega, R.Capin & T.Martínez. Enhanced mononuclear phagocytic activity during Trypanosoma cruzi infection in mice. Int.Arch.Allergy Appl.Immunol., 50: 232-242, 1976.
265. Cunningham, D.S., T.C.Hazen & R.E.Kuhn. Increased resistance to *Aeromonas hydrophila* in mice experimentally infected with Trypanosoma cruzi. J.Parasitol., 67: 468-474, 1981.



266. Mosca, W. & J.Plaja. Delayed hypersensitivity to heart antigens in Chagas' disease as measured by in vitro lymphocyte stimulation. J.Clin.Microbiol., 14: 1-5, 1981.
267. Bottaso, O.A., L.Mangiaterra, M.B.Luna, N.Amerio & J.C.Morini. Perfil inmunológico en pacientes con enfermedad de Chagas crónica. Medicina (Buenos Aires), 42: 136-140, 1982.
268. Amato Neto, V. & L. Hildebrando Pereira da Silva. Anticorpos heterofilos na doença de Chagas. Resultados obtidos em casos agudos e cronicos. Hospital, 45: 39-51, 1954.
269. Schmuñis, G.A., A.Szarfman, U.J.Pesce & S.M.González Cappa. The effect of acute infection by Trypanosoma cruzi upon the response of mice to sheep erythrocytes. Rev.Inst.Med.Trop.São Paulo, 19: 323-331, 1977.
270. Ortiz Ortiz, L., D.E.Parks, M.Rodríguez & W.O.Weigle. Polyclonal B lymphocyte activation during Trypanosoma cruzi infection. J.Immunol., 124: 121-126, 1980.
271. Corsini, A.C. & M.G.Costa. Immunosuppression in mice infected with Trypanosoma cruzi. I. Evidence of polyclonal B cell activation in experimental infections mimicked by an extract prepared from circulating trypanomastigotes. Rev.Inst.Med.Trop.São Paulo, 23: 114-121, 1981.
272. Clinton, B.A., L.Ortiz Ortiz, W.García, T.Martínez & R.Capin. Trypanosoma cruzi: early immune responses in infected mice. Exp.Parasitol., 37: 417-425, 1975.
273. Cunningham, D.S., R.E.Kuhn & E.C.Rowland. Suppression



- of humoral responses during Trypanosoma cruzi infections in mice. Infect.Immun., 22: 155-160, 1978.
274. Corsini, A.C., O.L.P.Oliveira & M.G.Costa. Humoral suppression in Trypanosoma cruzi infection in relation to the timing of antigen presentation. Z. Parazitenk., 64: 85-94, 1980.
275. Tanowitz, H.B., N.Minato, R.Lalonde & M.Wittner. Trypanosoma cruzi: correlation of resistance and susceptibility in infected inbred mice with the in vivo primary antibody response to sheep red blood cells. Exp.Parasitol., 52: 233-242, 1981.
276. Cunningham, D.S., M.Grogl & R.E.Kuhn. Suppression of antibody responses in humans infected with Trypanosoma cruzi. Infect.Immun., 30: 496-499, 1980.
277. Ramos, C., E.Lamoyi, M.Feoli, M.Rodríguez, M.Pérez & L.Ortiz Ortiz. Trypanosoma cruzi: immunosuppressed response to different antigens induced in the infected mouse. Exp.Parasitol., 45: 190-199, 1978.
278. Cunningham, D.S. & R.E.Kuhn. Trypanosoma cruzi-induced suppression of the primary immune response in murine cell cultures to T-cell dependent and -independent antigens. J.Parasitol., 66: 16-27, 1980.
279. Cunningham, D.S. & R.E.Kuhn. Trypanosoma cruzi-induced suppressor substance. I. Cellular involvement and partial characterization. J.Immunol., 124: 2122-2129, 1980.
280. Cunningham, D.S. & R.E.Kuhn. Trypanosoma cruzi-induced suppressor substance. II. Regulatory activity. Immunogenetics, 10: 557-572, 1980.



281. Cunningham, D.S. & R.E.Kuhn. Trypanosoma cruzi- induced suppressor substance. III. Activation of suppressor cells. J.Parasitol., 66: 881-887, 1980.
282. Cunningham, D.S., G.R.Benavidez & R.E.Kuhn. Differences in the regulation of humoral responses between mice infected with Trypanosoma cruzi and mice administered Trypanosoma cruzi-induced suppressor substance. J.Immunol., 125: 2317-2321, 1980.
283. Cunningham, D.S., R.E.Kuhn, R.L.Tarleton & R.S.Dunn. Trypanosoma cruzi: effect on B-cell-responsive and -responding clones. Exp.Parasitol., 51: 257-268, 1981.
284. Cunningham, D.S., R.E.Kuhn & F.M.Hatcher. Trypanosoma cruzi: responses by cells from infected mice to allo-antigens. Exp.Parasitol., 51: 141-151, 1981.
285. Torres, C.M. Sobre a anatomia patológica da doença de Chagas. Mem.Inst.Oswaldo Cruz, 36: 391-404, 1941.
286. Cossio, P.M., R.P.Laguens, C.Diez, A.Szarfman & R.M. Arana. Chagasic cardiopathy: antibodies reacting with plasma membrane of striated muscle and endothelial cells. Circulation, 50: 1252-1259, 1974.
287. Szarfman, A., P.M.Cossio, C.Diez, R.M.Arana & E. Sadun. Antibodies against endocardium vascular structures and interstitium of striated muscle that cross-react with Trypanosoma cruzi and T.rhodiense. J. Parasitol., 60: 1024, 1974.
288. Szarfman, A., E.L.Khoury, P.M.Cossio, R.M.Arana & I.G. Kagan. Investigation of the EVI antibody in parasitic diseases other than American Trypanosomiasis. Am.J. Trop.Med.Hyg., 24: 19-24, 1975.



289. Hubsch, R.M., A.J.Sulzer & I.G.Kagan. Evaluation of an autoimmune type antibody in the sera of patients with Chagas' disease. J.Parasitol., 62: 523-527, 1976.
290. Laguens, R.P., P.M.Cossio, C.Diez, A.Segal, C. Vasquez, E.Kreutzer, E.L.Khoury & R.M.Arana. Immunopathological and morphological studies of skeletal muscle in Chagas' disease. Am.J.Pathol., 80: 153-161, 1975.
291. Szarfman, A., P.M.Cossio, G.A.Schmuñis & R.M.Arana. The EVI antibody in acute Chagas' disease. J.Parasitol., 63: 149, 1977.
292. Schmuñis, G.A., P.M.Cossio, A.Szarfman, L.Coarasa & R.M.Arana. Tissue-reacting antibodies (EVI Antibodies) in Nifortimox-treated patients with Chagas' disease. J.Infect.Dis., 138: 401-404, 1978.
293. Khoury, E.L., C.Diez, P.M.Cossio & R.M.Arana. Heterophil nature of EVI antibodies in Trypanosoma cruzi infection. Clin.Immunol.Immunopathol., 27: 283-288, 1983.
294. Van der Geld, H., F.Peetoom, K.Somers & B.R.Kneyerezi. Immunohistological and serological studies in endomyocardial fibrosis. The Lancet, I: 1210-1213, 1966.
295. Shaper, A.G., M.H.Kaplan, W.D.Foster, D.M.Mackintosh & N.E.Wilks. Immunological studies in endomyocardial fibrosis and other forms of heart disease in the tropics. The Lancet, I: 598-600, 1967.
296. Szarfman, A., A.Luquetti, A.Rassi, J.M.Rezende & G.A.Schmuñis. Tissue-reacting immunoglobulins in patients



- with different clinical forms of Chagas' disease. Am. J.Trop.Med.Hyg., 30: 43-46, 1981.
297. Peralta, J.M., D.A.Manigot, E.O.A.Muscelli, T.C.R. Magalhaes, E.A.Almeida & A.Bastos. Anticorpos EVI e NP na infeccao chagásica crônica. Estudo em pacientes com diferentes formas clínicas. Rev.Inst.Med. Trop.São Paulo, 24: 6-10, 1982.
298. Ribeiro Dos Santos, R., J.C.R.Oliveira & M.A.Rossi. Antibody to neurons in chronic Chagas' disease. Trans. Roy.Soc.Trop.Med.Hyg., 70: 167, 1976.
299. Khoury, E.L., V.Ritacco, P.M.Cossio, R.P.Laguens, A. Szarfman, C.Diez & R.M.Arana. Circulating antibodies to peripheral nerve in American Trypanosomiasis (Chagas' disease). Clin.Exp.Immunol., 36: 8-15, 1979.
300. Wood, J.N., L.Hudson, T.M.Jessell & M.Yamamoto. A monoclonal antibody defining antigenic determinants on subpopulations of mammalian neurons and Trypanosoma cruzi parasites. Nature, 296: 34-38, 1982.
301. Sadigursky, M., A.M.Acosta & C.A.Santos Buch. Muscle sarcoplasmic reticulum antigen shared by a Trypanosoma cruzi clone. Am.J.Trop.Med.Hyg., 31: 934, 941, 1982.
302. Acosta, A.M., M.Sadigursky & C.A.Santos Buch. Anti-striated muscle antibody activity produced by Trypanosoma cruzi. Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 172: 364-369, 1983.
303. Szarfman, A., F.S.Laranja, W.de Souza, L.G.Quintao, D.Gerecht & G.A.Schmunis. Tissue-reacting antibodies in a rhesus monkey with long-term Trypanosoma cruzi



- infection. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, 27: 832-836, 1978.
304. Lenzi, H.L., J.G.A.Lenzi & Z.Andrade. Experimental production of EVI antibodies. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, 31: 48-52, 1982.
305. Sterin Borda, L., P.M.Cossio, M.F.Gimeno, A.L.Gimeno, C.Diez, R.P.Laguens, P.Cabeza Meckert & R.M.Arana. Effect of chagasic sera on the rat isolated atria preparation: immunological, morphological and functional aspects. *Cardiov.Res.*, 10: 613-622, 1976.
306. Gimeno, A.L., M.F.Gimeno, L.Sterin Borda, P.M.Cossio, N.Sterin Speziale, C.Diez, S.M.Seare & R.M.Arana. Altered inotropic and chronotropic effects of nor-adrenaline on isolated rat atria exposed to chagasic sera. Influences of cocaine, normetanephrine and U-0521 (3'-4'-dihydroxy-2-methylpropiofenone). *Cardiov.Res.*, 13: 723-731, 1979.
307. Sterin Borda, L., L.Canga, P.M.Cossio, C.Diez, R.M.Arana & A.L.Gimeno. Calcium ions and the influence of chagasic sera on the effects of ouabain on isolated rat atria. *Arch.Int.Pharmacodyn Thérapie*, 250: 93-107, 1981.
308. Sterin Borda, L., L.Canga, E.Borda, P.M.Cossio, C.Diez, R.M.Arana & A.L.Gimeno. Chagasic sera alter the effects of ouabain on isolated rat atria. Participation of adrenergic mechanisms. *Eur.J.Pharmacol.*, 69: 1-10, 1981.
309. Sterin Borda, L., S.Fink, C.Diez, P.M.Cossio & M.M.de E.de Bracco. Beta adrenergic effect of antibodies from chagasic patients and normal human lymphocytes on isolated rat atria. *Clin.Exp.Immunol.*, 50: 534-



540, 1982.

310. Szarfman, A., V.P.Terranova, S.I.Rennard, J.M. Foidart, M.E.Lima, J.I.Scheinman & G.R.Martin. Antibodies to laminin in Chagas' disease. J.Exp.Med., 155: 1161-1171, 1982.
311. Cossio, P.M., G.Damilano, M.T.de la Vega, R.P. Laguens, P.Cabeza Meckert, C.Diez & R.M.Arana. In vitro interaction between lymphocytes of chagasic individuals and heart tissue. Medicina (Buenos Aires), 36: 287-293, 1976.
312. Santos Buch, C.A. & A.R.L.Teixeira. The immunology of experimental Chagas' disease. III. Rejection of allogenic heart cells in vitro. J.Exp.Med., 140: 38-53, 1974.
313. Teixeira, A.R.L., G.Teixeira, V.Macedo & A.Prata. Trypanosoma cruzi-sensitized T-lymphocyte mediated <sup>51</sup>Cr release from human heart cells in Chagas' disease. Am.J.Trop.Med.Hyg., 27: 1097-1107, 1978.
314. de la Vega, M.T., G.Damilano & C.Diez. Leukocyte migration inhibition test with heart antigens in American Trypanosomiasis. J.Parasitol., 62: 129-130, 1976.
315. Peralta, J.M., K.Gill, M.F.C.Lima & J.R.Coura. Leukocyte migration inhibition response to tissue antigens in asymptomatic individuals infected with Trypanosoma cruzi. Clin.Exp.Immunol., 45: 621-626, 1981.
316. Wrightsman, R., S.Krassmer & J.Watson. Genetic control of responses to Trypanosoma cruzi in mice:



multiple gens influencing parasitemia and survival.  
Infect.Immun., 36: 637-644, 1982.

317. Trischmann, T., H.Tanowitz, M.Wittner & B.R.Bloom.  
Trypanosoma cruzi: role of the immune response in the  
natural resistance of inbred strains of mice . Exp.  
Parasitol., 45: 160-168, 1978.
318. Trischmann, T.M. & B.R.Bloom. Genetics of murine re-  
sistance to Trypanosoma cruzi. Infect.Immun., 35:  
546-551, 1982.
319. Tanowitz, H.B., P.Davies, S.M.Factor, T.Minase, A.  
Herskowitz & M.Wittner. Trypanosoma cruzi: Choline  
acetyltransferase activity in tissues of susceptible  
and resistant mice infected with the Brasil strain.  
Exp.Parasitol., 51: 269-278, 1981.
320. Boyer, M.H., R.Hoff, T.L.Kipnis, E.D.Murphy & J.B.  
Roths. Trypanosoma cruzi: susceptibility in mice  
carrying mutant gene Ipr (lymphoproliferation). Para-  
site Immunol., 5: 135-142, 1983.
321. Sher, A. & P.A.Scott. Genetic factors influencing the  
interaction of parasites with the immune system.  
Clin.Immunol.All., 2: 489-510, 1982.
322. Dvorak, J.A., T.E.Hall, M.S.J.Crane, J.C.Engel, J.P.  
McDaniel & R.Uriegas. Trypanosoma cruzi: flow cyto-  
metric analysis. I. Analysis of total DNA/organism  
by means of Mithramycin-induced fluorescence. J.  
Protozool., 29: 430-437, 1983.
323. Morel, C., E.Chiari, E.P.Camargo, D.M.Mattei, A.J.  
Romanha & L.Simpson. Strains and clones of Trypanoso-  
ma cruzi can be characterized by patterns of restrict-



ion endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. Proc.Natl.Acad.Sci., 77: 6810-6814, 1980.

324. Engel, J.C., J.A.Dvorak, E.L.Segura & M.S.J.Crane. Trypanosoma cruzi: biological characterization of 19 clones derived from two chronic chagasic patients. I. Growth kinetics in liquid medium. J.Protozool., 29: 555-560, 1982.
325. Burgess, D.E., R.E.Kuhn & K.S.Carlson. Induction of parasite-specific helper T lymphocyte during Trypanosoma cruzi infections in mice. J.Immunol., 127: 2092-2094, 1981.
326. Scott, M.T. Delayed hypersensitivity to Trypanosoma cruzi in mice: specific suppressor cells in chronic infection. Immunology, 44: 409-418, 1981.
327. Kress, Y., B.R.Bloom, M.Wittner, A.Rowen & H.Tanowitz. Resistance of Trypanosoma cruzi to killing by macrophages. Nature, 257: 394-396, 1975.
328. Zingales, B., N.W.Andrews, V.Y.Kuwajima & W.Colli. Cell surface antigens of Trypanosoma cruzi: possible correlation with the interiorization process in mammalian cells. Mol.Biochem.Parasitol., 6: 111-124, 1982.
329. Cerisola, J.A., R.Rohwedder, E.L.Segura, C.E.Del Prado, M.Alvarez & G.J.W.de Martini. El xenodiagnóstico. Secretaría de Estado de Salud Pública, Buenos Aires, 1974.
330. Budzko, D.B. & F.Kierszenbaum. Isolation of Trypanosoma cruzi from blood. J.Parasitol., 60: 1037, 1974.



331. Luquetti, A. & I.G. Da Silva. A presença do Trypanosoma cruzi em culturas de mononucleares separados de sangue de indivíduos chagásicos. VII Reu. Anual Pesq. Bás. en Doença Chagas, Abs. I-4, Cacambú, Brasil, 1980.
332. Gutteridge, W.E. & M. Gaborak. A re-examination of purine and pyrimidine synthesis in the three main forms of Trypanosoma cruzi. Int.J. Biochem., 10: 415-422, 1979.
333. Bøyum, A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. Scand.J. Immunol., 5 (Suppl.5): 9-18, 1976.
334. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr & R.J. Randall. Protein measurement with the Pholin-phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275, 1951.
335. Margni, R.A. Reacción antígeno-anticuerpo in vitro. Interacción secundaria. En Inmunología e Inmunquímica (R.A. Margni, Ed.), 3º Edición, pp 237-269. Ed. Panamericana, Buenos Aires, 1982.
336. Alvarez, M., J.A. Cerisola & R. Rohwedder. Test de inmunofluorescencia para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Bol. Chil. Parasitol., 23: 4-9, 1968.
337. González Cappa, S.M., A. Bronzina, A.M. Katzin, H. Golfera, G.W. de Martini & E.L. Segura. Antigens of subcellular fractions of Trypanosoma cruzi. III. Humoral immune response and histopathology of immunized mice. J. Protozool., 27: 467-471, 1980.
338. Segura, E.L., P. Cabeza Meckert, M. Esteva, R. Gelpi, A.R. de Campanini, E. Subías & R.P. Laguens. Acción de las fracciones subcelulares de Trypanosoma cruzi so-



bre la enfermedad de Chagas crónica en el ratón. I. Inducción de cardiopatía en ausencia de infección. Medicina (Buenos Aires), 40: 807, 1980.

339. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage TA. Nature, 227: 680-681, 1970.
340. Cerisola, J.A. & M.B.Rosenbaum. La reacción del complemento para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. I. Técnica. Prensa Méd.Arg., 45: 1551-1557, 1958.
341. Cerisola, J.A., M.Alvarez, G.J.W.de Martini & H. Bonacci. La reacción de hemaglutinación cualitativa para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Bioquímica Clínica (Argentina), 5: 94-99, 1971.
342. Documenta Geigy Scientific tables (K.Diem Ed.), 6th Edition, pp 153-154. Geigy Pharmaceuticals, New York, 1962.
343. Segura, E.L., I.Paulone, J.A.Cerisola & S.M.González Cappa. Experimental Chagas' disease: protective activity in relation with subcellular fractions of the parasite. J.Parasitol., 62: 131-133, 1976.
344. Barral, A.M.P., M.Barral-Neto, A.Rassi, J.Rezende & R.da Gusmao. Reação mista linfocitária autóloga na infecção humana pelo Trypanosoma cruzi. IX Reu.Anual Pesq.Bás.em Doença Chagas, Abs.09, Caxambú, Brasil, 1982.
345. Wegner, D.H.G. & R.W.Rohwedder. Experience with Nifurtimox in chronic Chagas' infection. Preliminary Report. Arzneim.Forsch., 22: 1635-1638, 1972.



346. Cancado, J.R., V.D.Marra, M.López, O.Mourao, C.A.F. Faría, J.M.Alvarez & A.de A.Salgado. Toxicidad y valor terapéutico del Bay 2502 en la enfermedad de Chagas crónica en tres esquemas posológicos. Bol.Chil. Parasitol., 24: 28-32, 1969.
347. Cerisola, J.A. Chemotherapy of Chagas' infection in man. En Chagas' disease. PAHO Scientific Publications; 347: 35-47, 1977.
348. Moreno, M., J.C.Lansetti, J.Marletta, A.Voller & E.L.Segura. Estudio de una técnica inmunoenzimática para la Enfermedad de Chagas. Actas del II Cong.Latinoam.de Hemoterapia e Inmunohematología, pag. 1982.
349. Freilij, H., A.Marcipar, E.Tiscar, E.Subías, E.Segura & J.Yanovsky. Determination of anti-T.cruzi-IgM by binding and detection by direct agglutination in patients with chagasic infection. J.Protozool. En prensa.
350. Cossio, P.M. Comunicación personal.
351. Voller, A., D.E.Bidwell, A.Bartlett & R.Edwards. A comparison of isotropic and enzyme-immunoassays for tropical parasitic diseases. Trans..Roy.Soc.Trop. Med.Hyg., 71: 431-437, 1977.
352. Voller, A., C.C.Draper, D.E.Bidwell & A.Bartlett. Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for Chagas' disease. The Lancet, 1: 426-427, 1975.
353. González Cappa, S.M., A.I.Cantarella, S.Lajmanovich & E.L.Segura. Experimental Chagas' disease: studies on the stability of a protective antigen. J. Parasitol., 62: 130-131, 1976.